



Suplementação de ovelhas Merino Branco com dois níveis de Tremoço Branco (*Lupinus albus*) no período pré-cobrição: efeito sobre o estado nutricional e a performance reprodutiva

Ana Elisabete Carvalho Viana

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Zootécnica – Produção Animal

Orientador: Doutora Sandra Cristina Pires dos Santos Cavaco-Gonçalves

Co-orientador: Doutor Rui Manuel de Vasconcelos e Horta Caldeira

Júri:

Presidente - Doutor João Pedro Bengala Freire, Professor Catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Vogais - Doutor Rui Manuel de Vasconcelos e Horta Caldeira, Professor Catedrático da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa

- Doutor Fernando Baltazar Santos Ortega, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

- Doutora Sandra Cristina Pires dos Santos Cavaco-Gonçalves, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Recursos Biológicos, I.P.

Lisboa, 2010

AGRADECIMENTOS

Quero aqui expressar os meus agradecimentos a todos os que me apoiaram, encorajaram e ajudaram, ao longo deste projecto.

À Dra. Sandra Cavaco, minha orientadora, pela paciência, ajuda, conselhos e orientação, ao longo de todo o trabalho.

Ao Dr. Rui Caldeira, meu professor e co-orientador pela disponibilidade, ajuda e orientação ao longo deste trabalho.

À Unidade de Recursos Genéticos, Reprodução e Melhoramento Animal do L-INIA e a todos os seus membros por me terem disponibilizado todas as condições (instalações e material) e a ajuda, indispensáveis à execução experimental.

À Eng. Maria João Fradinho pelas longas horas que disponibilizou para me auxiliar nas análises laboratoriais.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa por todo o apoio fornecido, também a nível de instalações laboratoriais.

À minha família e amigos pelo apoio prestado durante todo o curso e durante o trabalho.

RESUMO

Estudou-se o efeito da suplementação com *Lupinus albus* sobre indicadores metabólicos (ureia sérica, albumina, glucose, AGNE e insulina) e reprodutivos (fertilidade e prolificidade) de ovelhas Merino Branco (condição corporal estável). Utilizaram-se 3 grupos de 15 ovelhas, com um protocolo de sincronização de estro (D0-D6). De D1 a D6 fez-se a suplementação com uma dieta sem tremoço (GC), uma dieta com 0,4 kg (GT400), e dieta com 0,6 kg de tremoço (GT600). As dietas dos grupos GC e GT600 eram isoproteicas e isoenergéticas. A suplementação aumentou o peso vivo nos 3 grupos, mas não a CC. Os valores dos indicadores metabólicos permitiram concluir que os animais se encontravam nutricionalmente equilibrados. A subida da concentração de ureia entre D1 e D6 no grupo GC, mas não no grupo GT600, sugere que o tremoço poderá ter uma proteína menos degradável ou melhor relação proteína/energia. O diferente padrão de secreção da insulina nas dietas com tremoço, sugere um maior potencial insulínico, provavelmente por uma produção mais lenta da glucose. A ausência de diferenças nos indicadores reprodutivos sugere que a maior taxa de ovulação obtida por outros autores após a suplementação com tremoço se deve ao aumento do fornecimento energético e/ou proteico e não a qualquer componente específico daquela semente.

Palavras-chave: tremoço, ovelha, Merino Branco, indicadores metabólicos, fertilidade, prolificidade

ABSTRACT

It was studied the effect of *Lupinus albus* supplementation on metabolic (serum urea, albumin, glucose, insulin, and NEFA) and reproductive parameters (fertility, prolificacy) of Merino Branco ewes (stabilized body condition). Three groups of 15 oestrus synchronized ewes (D0-D6) were supplemented (D1-D6) with a diet without lupin (GC), a diet with 0,4 kg (GT400), and a diet with 0,6 kg of lupin (GT600). Diets of GC and GT600 were isoproteic and isoenergetic. Live weight, but nor BC, increased after supplementation on the three groups. Concentration of metabolic parameters showed that nutritional status was balanced in all animals. Urea concentration increased between D1 and D6 on GC, but not on GT600, suggesting that lupin protein might have a lower degradability, or a better balance between protein and energy content. Lupin diet groups had a different secretion pattern of insulin suggesting that lupin might induce a higher insulin production, probably due to a slower glucose production. Reproductive parameters were not different between groups. These results suggest that the increase in ovulation rate after lupin supplementation, observed by others, is due to the increment in energy and/or protein given and not to any particular component of lupin.

Key-words: lupinus, ewe, White Merino, metabolic parameters, prolificacy, fertility.

EXTENDED SUMMARY

Sheep production is a livestock activity with great importance in Portugal. However, producers are currently faced with great difficulties, either due to production costs, either due to political and social factors. Currently, due to the politic-economic scenario, producers have turned to the production of meat, which requires high productivity of the herd, especially with regard to reproduction.

One way around some of the problems that are imposed on our producers is optimizing the production, both in terms of livestock nutrition costs, and in terms of market outlets of the animals for human consumption. The manipulation of reproduction using nutrition is an inexpensive management tool to control the ovulation rate, since the lower ovulation rate in merino ewes has been identified as a limiting factor in reproductive performance of commercial flocks. One method that has been widely applied, either in sheep or in other species is the *flushing*.

With increasing concern for the animals' welfare and health, and after the animal protein being banned from ruminants food, other sources of protein have been explored, including vegetables, as the white lupin seed used in this project. However, the mechanisms of lupine's action on the reproductive performance of animals have not been clarified, and the authors' opinion differs about its effectiveness. Also lupin has some limitation on its use due to the fact that it has some anti-nutritional factors, namely alkaloids that give a bitter taste and causes rejection by the animals.

The aim of this trial was to evaluate the effect of *Lupinus albus* supplementation on metabolic (serum urea, albumin, glucose, insulin, and non esterified fatty acids) and reproductive parameters (fertility, prolificacy) of Merino Branco ewes in a stabilized body condition score (BCS).

Three groups (GC, GT400 and GT600) of 15 animals each were used. After a period of habituation to lupinus (GT400 and GT600), oestrus was induced and synchronized in all ewes by means of progestagen vaginal sponges (Chronogest®), from D0 to D6, and administration of 100 µg of cloprostenol on D5. On D7 and D8, oestrus detection and mating

were performed by entire rams. BCS was evaluated on D-1 and 6, and live weight (LW) was registered on D-1 and 11. Ewes were supplemented from D1 to D6 with a diet without lupin (GC), a diet with 0.4 kg of lupin (GT400), or a diet with 0.6 kg of lupin (GT600). Diets of GC and GT600 had the same amounts of protein and energy. On days -5, 2, 4, 6 and 14 blood samples were taken for analysis of the above referred metabolic parameters..

The voluntary feed intake was not different between groups ($P > 0,05$) except for group GT600, where there was a slight decrease in intake ($P=0.054$), probably due to the high amount of alkaloids in the lupine seeds used (0.4%). The increase in crude protein and metabolizable energy during the period of supplementation was sufficient to increase the weight in the three groups, but not to increase body condition. All the metabolic parameters evaluated were within the values recommended for the species, indicating that all animals were on a balanced nutritional status.

Urea concentration increased between D1 and D6 on group GC, but not on group GT600, suggesting that lupin protein might have a lower degradability or a better balance between protein and energy content. Lupin diet groups had a different secretion pattern of insulin suggesting that lupin might induce insulin production differently, probably due to a slower glucose production resulting from the type of carbohydrates present in the seed.

Reproductive parameters were not different between groups. These results suggest that the increase in ovulation rate after lupin supplementation, observed by others, is due to the increment in energy and/or protein given and not to any particular component of lupin.

ÍNDICE

Resumo
Abstract
Extended Summary
Índice de figuras
Índice de tabelas
Lista de abreviaturas

	Pág.
I. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
II.1. Breve caracterização da raça Merino Branco	3
II.2. Actividade reprodutiva na ovelha	5
II.2.1. Desenvolvimento folicular e diferenciação	7
II.2.1.1. Fase inicial de desenvolvimento folicular	7
II.2.1.2. Fase de crescimento: ondas de folículos antrais	7
II.2.2. Taxa de ovulação	11
II.3. influência da nutrição na performance reprodutiva	12
II.3.1. Condição corporal e a sua influência na taxa de ovulação	16
II.4. Tremoço	16
II.4.1. Composição química do tremoço	17
II.4.1.1. Hidratos de carbono	17
II.4.1.2. Proteína	17
II.4.1.3. Lípidos	18
II.4.1.4. Factores anti-nutricionais	19
II.5. Suplementação alimentar no curto prazo – Flushing	20
II.5.1. Suplementação com tremoço	21

II.6. Indicadores metabólicos para avaliação do estado nutricional	22
II.6.1. Leptina	23
II.6.2. Indicadores do estado energético do animal	24
II.6.2.1. Glucose e insulina	24
II.6.2.2. Ácidos gordos não esterificados	26
II.6.3. Indicadores do estado proteico do animal	27
II.6.3.1. Ureia	27
II.6.3.2. Albumina	28
 III. MATERIAIS E MÉTODOS	 29
III.1. Delineamento experimental	29
III.2. Avaliação da condição corporal e pesagem dos animais	30
III.3. Alimentação	31
III.4. Controlo da actividade reprodutiva	34
III.5. Recolha de amostras de sangue e métodos analíticos de doseamento ..	34
III.6. Indicadores reprodutivos	35
III.7. Tratamento estatístico	35
 IV.RESULTADOS E DISCUSSÃO	 36
IV.1. Análise da ingestão voluntária de alimento	36
IV.2. Peso vivo e condição corporal	38
IV.3. Indicadores metabólicos	40
IV.3.1. Ácidos gordos não esterificados	40
IV.3.2. Ureia	42
IV.3.3. Glucose e insulina	43
IV.3.4. Albumina	46
IV.4. Indicadores reprodutivos	47

V. CONCLUSÕES	49
V.1. Ingestão de alimento	49
V.2. Estado nutricional	49
V.3. Indicadores reprodutivos	50

VI.BIBLIOGRAFIA CITADA

Anexo I

Anexo II

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Ovelha Merino Branco	3
Figura 2: Eventos principais que ocorrem durante uma onda folicular	10
Figura 3: Influência dos efeitos dinâmico e estático da nutrição na taxa de ovulação da ovelha	12
Figura 4: Variação na percentagem de proteína e gordura em sementes de tremçoço branco (<i>L. albus</i>) de diferentes genótipos	18
Figura 5: Animais utilizados no ensaio e sala de ensaio	29
Figura 6: Avaliação da condição corporal por palpação da região lombar	31
Figura 7: Ingestão voluntária diária de alimento (média \pm erro padrão) em cada um dos grupos	36
Figura 8: Peso vivos (média \pm EP) dos animais dos grupos GC, GT400 e GT600 antes (D0) e após o final do período de suplementação (D11).	38
Figura 9: Condição corporal (média \pm EP) dos animais dos grupos GC, GT400 e GT600 antes (D0) e no final do período de suplementação (D6)	39
Figura 10: Concentração sérica dos AGNE (média \pm erro padrão) ao longo do tempo nos grupos GC, GT400e GT600	40
Figura 11: Concentração sérica de ureia (média \pm erro padrão) ao longo do tempo nos grupos GC, GT400e GT600	42

Figura 12: Concentração sérica de glucose (mmol/L; média \pm erro padrão) e plasmática de insulina (μ UI/mL; média \pm erro padrão) nos grupos GC, GT400e GT600 ao longo do tempo

44

Figura 13: Concentração sérica de albumina (g/L; média \pm erro padrão) ao longo do tempo nos grupos GC, GT400e GT600

46

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1: Índices técnicos produtivos e reprodutivos da Raça Merino Branco	4
Tabela 2: Taxas de ovulação conhecidas de várias raças de ovelhas prolíficas	11
Tabela 3: Algumas das associações conhecidas entre o balanço energético e a reprodução	14
Tabela 4: Composição química e valor nutritivo de três espécies de tremço	19
Tabela 5: Valores de concentrações séricas ou plasmáticas de glucose (mmol/L) e de insulina (μ U/ml) em ovelhas	25
Tabela 6: Valores de concentrações séricas de AGNE (mmol/L) em ovelhas	26
Tabela 7: Valores de concentrações séricas de ureia (mmol/L) em ovelhas	28
Tabela 8: Valores de concentrações séricas de Albumina (g/L) em ovelhas	28
Tabela 9: Calendário das actividades realizadas no ensaio	30
Tabela 10: Composição do alimento composto O3	31
Tabela 11: Composição nutricional do alimento fornecido antes do início do ensaio para obtenção de CC de 2,5 em todos os animais	32
Tabela 12: Composição da dieta fornecida desde a constituição dos grupos até ao final do período de habituação	33
Tabela 13: Composição da dieta fornecida durante o período experimental (D1 a D6) aos três grupos em ensaio	33

Tabela 14: Ingestão voluntária (%) do total de alimento distribuído diariamente	37
Tabela 15: Concentração sérica de AGNE (mmol/L) ao longo do tempo nos grupos GC, GT400e GT600	41
Tabela 16: Concentração sérica de ureia (mmol/L) ao longo do tempo nos grupos GC, GT400e GT600	43
Tabela 17: Concentração sérica de glucose (mmol/L; média ± erro padrão) nos grupos GC, GT400e GT600 ao longo do tempo	44
Tabela 18: Concentração plasmática de insulina (μUI/mL; média ± erro padrão) nos grupos GC, GT400e GT600 ao longo do tempo	45
Tabela 19: Concentração sérica de albumina (g/L) ao longo do tempo nos grupos GC, GT400e GT600	46
Tabela 20: Intervalo entre a remoção de esponjas e o estro nos grupos GC, GT400 e GT600	47
Tabela 21: Taxas de fertilidade, prolificidade e de partos duplos e peso médio dos borregos nascidos nos grupos GC, GT400 e GT600	48

LISTA DE ABREVIATURAS

CC – Condição corporal

PV – peso vivo

TO – Taxa de ovulação

AGNE – Ácidos gordos não esterificados

MS – matéria seca

EM – energia metabolizável

PB – proteína bruta

GB – gordura bruta

FB – fibra bruta

Dig.MO – digestibilidade da matéria orgânica

NDF – Neutral-detergent fibre

PgF₂ α – Prostaglandina F₂ α

UI – unidades de insulina

FSH – Follicle Stimulating Hormone

LH – Luteinizing Hormone

GnRH – Gonadotropin Release Hormone

IGF-1 – Insulin Growth Factor - 1

I. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

Um dos objectivos principais dos sistemas de produção de ovinos tem sido o aumento da quantidade de produto final obtido por animal, nomeadamente a produção de carne (Selaive-Villarroel, 1986 *cit.* Mori *et al.*, 2006), tendo para isso sido desenvolvidos programas de melhoramento genético, dietas, técnicas reprodutivas e de manejo geral que deram origem a melhorias nos processos produtivos (Caldeira, 2005), principalmente no que se refere à reprodução (Selaive-Villarroel, 1986 *cit.* Mori *et al.*, 2006).

Os ovinos possuem variadas características que os favorecem em relação às outras espécies, para a utilização e aproveitamento de pastagens na zona mediterrânica (Caldeira, 1988). São elas:

- A adaptação do seu sistema de preensão do alimento ao pastoreio de plantas de pequena altura;
- O isolamento térmico proporcionado pelo seu pelo que fornece uma barreira eficaz para variações de temperatura, proporcionando-lhe uma melhor tolerância tanto ao calor como ao frio, em relação aos bovinos (Blaxter, 1962 *cit.* Caldeira, 1988);
- Um menor metabolismo basal, relativamente aos bovinos.

As fêmeas não conseguem satisfazer as suas necessidades nutricionais durante todo o ciclo reprodutivo, seja por condicionantes fisiológicas que diminuam a sua capacidade de ingestão, seja por carências sazonais de alimentos (Purroy, 1987 *cit.* Caldeira, 1988; Caldeira, 1995; Caldeira e Vaz Portugal, 1998). Como forma de adaptação às variações na disponibilidade de alimentos, os animais armazenam reservas corporais quando aquela ultrapassa as suas necessidades, ou mobilizam-nas quando é insuficiente para a manutenção dos seus processos fisiológicos (Morand-Fehr, 1987, Bocquier, 1988 *cits.* Caldeira, 1988; Caldeira, 1995; Caldeira e Vaz Portugal, 1998).

A baixa taxa de ovulação nas ovelhas Merino tem sido identificada como um factor limitante da performance reprodutiva dos rebanhos comerciais (Lindsay, 1975 *cit.* Nottle *et al.*, 1997b). A manipulação da reprodução, usando a nutrição tanto a longo prazo como a curto prazo – *flushing* - é uma ferramenta de gestão relativamente barata que permite controlar a taxa de ovulação e a prolificidade principalmente nos sistemas de produção extensivos, em regiões semi-áridas e mediterrânicas (Scaramuzzi *et al.*, 2006).

Dadas as frequentes variações das conjunturas e políticas comerciais e produtivas internacionais, é indispensável que os nossos produtores adquiram uma sólida formação

técnica que lhes permita conjugar de uma forma flexível mas eficiente os novos conhecimentos científicos com as realidades das condições de produção e dos mercados (Caldeira, 1995).

O objectivo deste trabalho foi o estudo do efeito de diferentes níveis de suplementação com tremço branco (*Lupinus albus*), sobre alguns indicadores metabólicos (ureia, albumina, glucose, ácidos gordos não esterificados e insulina) e reprodutivos (fertilidade, prolificidade, taxa de partos duplos e peso médio dos borregos nascidos) de ovelhas Merino Branco em condição corporal média (2,5) e estável. Consiste na continuação de um trabalho realizado anteriormente, em que se estudou o efeito do tremço branco em condições de aumento e estabilidade de condição corporal média-elevada (3,25). Estes estudos estão inseridos no projecto “Efeito da suplementação com tremço no período de pré-cobrição sobre a fisiologia e performance reprodutiva de ovelhas Merino Branco” subsidiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1) Breve caracterização da raça Merino Branco

A raça Merino Branco resultou da evolução da população Merina que no início do século XX existia no sul de Portugal. Nessa altura, a principal fonte de rendimento da exploração ovina era a lã, que apresentava uma excelente qualidade nos animais desta raça (Penha, 2002).

As raças autóctones, nomeadamente a raça Merino Branco, caracterizam-se pela sua extraordinária rusticidade, traduzida numa perfeita adaptação às condições edafoclimáticas e num bom aproveitamento dos recursos naturais da região (Lucas *et al.*, 2001). Esta raça, com origem na região do Alentejo, conforme já referimos, possuía no ano de 1999 cerca de 22000 animais inscritos no Livro Genealógico (www.vetpermutadora.pt) e em 2007 apenas 17000, num total de 40 criadores (Fonte: EZN, Unidade de Recursos Genéticos Reprodução e Melhoramento Animal). Em 2009, segundo a Sociedade Portuguesa de Ovinotecnia e Caprinotecnia existiam apenas 9000 animais inscritos no Livro Genealógico, pertencentes a 22 criadores (www.ovinosecaprinos.com).



Figura 1: *Ovelha Merino Branco*

Com a desvalorização da lã, o regime produtivo dos ovinos orientou-se ao longo do tempo para uma valorização do binómio carne - leite (Leitão, 1964, *cit.* Oliveira, 2001). A prioridade da produção de carne de borrego fez com que todo o maneio da exploração tenha sofrido uma evolução e adaptação com o objectivo de aumentar a produtividade e de colocar borregos no mercado nas épocas de maior valorização, que tradicionalmente correspondem aos períodos do Natal e da Páscoa (Alvarez, 1995 *cit.* Oliveira, 2001).

Actualmente existe uma forte tendência para a produção de borregos com denominação de origem, com vista à sua valorização (Simões *et al.*, 2003). Associados a

esta raça existem como produtos certificados o Borrego do Baixo Alentejo (IGP), o Borrego do Nordeste Alentejano (IG) e o Borrego de Montemor-o-Novo (IGP) (www.vetpermutadora.pt). Para beneficiar desta designação, os borregos terão de ser da raça Merino (puros ou cruzados com raças melhoradas e Merino Branco), a qual representa cerca de 80% do efectivo ovino existente na área geográfica delimitada, abatidos entre os 90 e os 120 dias de idade, com carcaças entre os 9 e os 12 kg de peso, com uma proporção de gordura subcutânea entre os 6 e os 10% correspondentes às classes 2 e 3 da grelha de classificação comunitária de borregos leves (CEE, 1992/93) e provenientes de sistemas extensivos ou semi-intensivos (Simões *et al.*, 2003).

Os indicadores técnicos produtivos e reprodutivos da raça Merino Branco encontram-se expressos na tabela seguinte:

	Raça Merino Branco	
	Inquérito aos produtores em 1997 (Lucas <i>et al.</i> , 2001)	Sociedade Portuguesa de Ovinotecnia e Caprinotecnia
<u>Taxa de fertilidade anual</u> (nº de ovelhas paridas / nº ovelhas postas à cobrição)	95 %	80 – 90 %
<u>Prolificidade</u> (nº borregos nascidos / nº ovelhas paridas)	110 %	110 – 140 %
<u>Fecundidade</u> (nº borregos nascidos / nº ovelhas postas à cobrição)		90 – 130 %
Idade ao desmame	3,5 meses	
Idade da fêmea à 1ª cobrição	18 meses	

Tabela 1: *Índices técnicos produtivos e reprodutivos da Raça Merino Branco. Adaptado de: Lucas et al., 2001 e SPOC*

2) Actividade reprodutiva na ovelha

A ovelha é um ruminante poliéstrico sazonal com um padrão reprodutivo caracterizado por dois ciclos distintos: um ciclo éstrico que tem a duração média de 16 a 17 dias e está dividido em fase folicular e fase lútea (Henderson, 1990; Scaramuzzi *et al.*, 1993) e um ciclo anual de actividade ovárica, determinado pelo fotoperíodo (Viñoles, 2003).

Este ciclo anual de actividade ovárica, que se traduz na sazonalidade da reprodução, surgiu como forma de adaptação à variação sazonal de temperatura e disponibilidade de alimento que os animais das zonas de climas temperados têm de enfrentar (Triéry, 2002 *cit. Vasques et al.*, 2006; Rosa e Bryant, 2003), para que os nascimentos ocorressem na época mais favorável do ano, normalmente a Primavera, permitindo que os recém-nascidos crescessem sob condições de temperatura e de disponibilidade de alimento favoráveis (Wayne, 1989 *cit. Rosa e Bryant, 2003; Triéry, 2002 cit. Vasques et al.*, 2006). Assim, no caso concreto das ovelhas, estas apenas se tornam sexualmente activas em resposta à diminuição da duração dos dias (final do Verão, início do Inverno), sendo portanto “reprodutores de dias curtos”. Denominam-se poliéstricos sazonais de dias curtos, sendo a sazonalidade reprodutiva uma característica limitante da sua produtividade, uma vez que nos sistemas de produção comercial estas podem não ser as épocas que os agricultores mais desejam para a obtenção e venda dos seus produtos (Scaramuzzi *et al.*, 2006).

A fase folicular do ciclo éstrico, com uma duração aproximada de 36 a 40 horas, tem início após a regressão do corpo lúteo do ciclo éstrico anterior, a qual apenas ocorre se a ovelha não ficar gestante. A redução da concentração de progesterona permite a libertação de GnRH pelo hipotálamo, a qual induz um aumento na frequência dos pulsos de LH e de FSH libertados pela hipófise, levando ao desenvolvimento folicular e à produção de estradiol pelos folículos em desenvolvimento (Smeaton e Robertson, 1971, Brand e Jong, 1973 *cits. Viñoles, 2003; McNatty et al.*, 1985, Fortune, 1991 *cits. Scaramuzzi et al.*, 1993). À medida que o folículo aumenta de tamanho e atinge a maturação, a quantidade de estradiol que ele produz aumenta até um valor máximo, o pico pré-ovulatório, após o que se reduz para valores basais (Henderson, 1990; Scaramuzzi *et al.*, 1993). O pico pré-ovulatório de estradiol actua no hipotálamo, cuja GnRH induz a libertação de um pico de FSH e do pico ovulatório de LH, o qual desencadeia a maturação final do folículo e a sua ruptura com a libertação do ócito numa quantidade relativamente abundante de fluido – ovulação – aproximadamente 24 horas depois (Cahill *et al.*, 1979; Henderson, 1990; Scaramuzzi *et al.*, 1993; Viñoles, 2003)

Tem início então, a fase lútea do ciclo éstrico, caracterizada por concentrações elevadas de progesterona, produzidas por uma estrutura amarela designada corpo lúteo, formada pela luteinização das células foliculares após a ovulação (Henderson, 1990; Knight e Claire, 2006). As concentrações de progesterona começam a aumentar por volta do dia 3 a 4 do ciclo éstrico (2 a 3 dias depois da ovulação) à medida que o novo corpo lúteo se torna activo (Stabenfeldt, 1969, Thornburn, 1969, Edgar, 1985 *cits.* Bartlewski *et al.*, 1999b; Scaramuzzi *et al.*, 1993; Ashworth *et al.*, 1989). A concentração máxima de progesterona é observada nos dias 10 a 12 e é mantida até à luteólise, nos dias 14 e 15 do ciclo éstrico (Stabenfeldt, 1969, Thornburn, 1969, Edgar, 1985 *cit.* Bartlewski *et al.*, 1999b; Scaramuzzi *et al.*, 1993; Ashworth *et al.*, 1989), sendo esta concentração proporcional ao número de corpos lúteos presentes (Thurburn, 1969 *cit.* Findlay e Cumming, 1976). A regressão do corpo lúteo na ovelha envolve duas fases: uma diminuição da função lútea, na qual se observa uma redução gradual na secreção de progesterona, com início no dia 13 do ciclo e a luteólise, no dia 15 a 16 do ciclo éstrico por acção da $\text{PgF}_{2\alpha}$, produzida no útero (Baird, 1975 *cit.* Bartlewski *et al.*, 1999b; Henderson, 1990; Goodman 1994, *cit.* Viñoles, 2003).

A elevada concentração de estradiol existente no fim da fase folicular, antes da ovulação, é responsável pela receptividade da fêmea ao macho (cio) durante um período de cerca de 24 a 36 horas. Os sinais de cio nas ovelhas são muito menos pronunciados do que nas vacas e não são detectados a não ser que os machos estejam com as ovelhas (Henderson, 1990), induzindo nelas o reflexo de imobilidade. O estradiol tem outra função importante, que é a de permitir que a ocitocina provoque contracções na parede do útero, facilitando a progressão espermática até ao ócito (Henderson, 1990).

Se a ovelha estiver gestante, então o corpo lúteo irá persistir por várias semanas segregando progesterona que vai actuar na hipófise para inibir a secreção de FSH e de LH, para que a ovelha não entre em estro novamente (Henderson, 1990; Knight e Caire, 2006). Variações na concentração de progesterona devido a factores como a nutrição (Abecia *et al.*, 2006), a genética ou o ambiente (Ashworth *et al.*, 1989) podem induzir uma assíncronia entre o embrião e o útero, resultando na falha de estabelecimento da gestação. O sincronismo destes eventos é importante, por isso é essencial que os ócitos sejam libertados numa altura que coincida com a cobrição, para que as hipóteses de fertilização sejam máximas (Henderson, 1990).

2.1) Desenvolvimento folicular e diferenciação

Os folículos são as unidades funcionais do ovário e cada um consiste num oócito circundado por uma ou mais camadas de células foliculares (Knight e Claire, 2006).

Na ovelha, as populações de folículos primordiais (folículos formados por um oócito desprovido de zona pelúcida, circundado por uma camada de células da granulosa e que ainda não sofreram qualquer crescimento) e de folículos primários são a reserva folicular formada mesmo antes ou logo após o nascimento (Driancourt *et al.*, 1991).

2.1.1) Fase inicial de desenvolvimento folicular

Esta fase consiste no crescimento do folículo primordial até à fase de folículo pré-antral (0,2 mm de diâmetro; Fortune, 2003). Diariamente, cerca de 3 a 4 folículos ovários passam de folículos primordiais para o contingente de folículos primários em crescimento (Van Wezel e Rodgers, 1996). É uma fase de crescimento lento, que demora cerca de 130 dias e parece ser independente das gonadotrofinas (Lindsay *et al.*, 1993; Wandji *et al.*, 1992, McNatty *et al.*, 1999, Campbell *et al.*, 2000, Fortune *et al.*, 2000 *cits.* Webb *et al.*, 2004; Campbell, 2003b, Webb, 2003 *cit.* Hunter *et al.*, 2004). Apesar de vários autores citados numa revisão de Fortune (2003) referirem variações na capacidade da FSH e da LH no desenvolvimento de folículos pré-antrais, pensa-se que se as gonadotrofinas participam de alguma forma na progressão dos folículos pré-antrais, o seu papel será apenas permissivo e não decisivo (Campbell, 2003b, Webb, 2003 *cits.* Hunter *et al.*, 2004; Knight e Caire, 2006). Contudo, até ao final desta fase da foliculogénese os folículos têm que desenvolver sensibilidade às gonadotrofinas, um importante pré-requisito para o subsequente crescimento e maturação foliculares (Campbell *et al.*, 1995).

2.1.2) Fase de crescimento: ondas de folículos antrais

A fase de crescimento folicular é definida como o período de tempo em que um folículo antral cresce desde a emergência (2 a 3 mm de diâmetro) até ao seu tamanho máximo. É uma fase de rápido crescimento e requer a presença de gonadotrofinas.

Imediatamente após a formação do antro, os folículos já sensíveis às gonadotrofinas (Scaramuzzi *et al.*, 1993), crescem a um ritmo lento, demorando cerca de 30 dias a passarem de 0,2 a 0,7 mm de diâmetro. No final desta fase, o seu crescimento é mais rápido, demorando cerca de 5 dias para aumentar o diâmetro de 0,8 mm para 2,5 mm (fase rápida do crescimento). É neste último estágio que ocorre o recrutamento, a selecção e o

desenvolvimento do folículo dominante. A taxa de crescimento de um folículo desde o seu recrutamento até ao tamanho pré-ovulatório é aproximadamente 1mm/dia (Bartlewski *et al.*, 1999a; Evans *et al.*, 2000; Viñoles, 2003).

As diferentes etapas de desenvolvimento folicular decorrem de uma forma cíclica, designando-se este crescimento por ondas foliculares, as quais são constituídas pela sequência de recrutamento, selecção e dominância folicular ao longo do tempo. Na ovelha adulta, uma onda folicular é definida como o recrutamento de 1 a 4 folículos que crescem em simultâneo desde os 2 – 3 mm de diâmetro até um tamanho ovulatório de 4 a 7 mm, dos quais um é seleccionado para continuar o seu crescimento, tornando-se o folículo dominante, e ovular (Bartlewski *et al.*, 1999ab; Rawlings *et al.*, 2003). Enquanto cresce, o folículo dominante promove a atresia dos restantes folículos (Adams, 1992, Sunderland, 1994, Evans, 1997 *cits.* Evans *et al.*, 2000; Noel *et al.*, 1993; Viñoles, 2003; Knight e Caire, 2006). O recrutamento dura entre 36 a 48 horas (Souza *et al.*, 1998; Bartlewski *et al.*, 1999b), sendo imprescindível a presença de FSH (Scaramuzzi *et al.*, 1993; Driancourt, 2001; Viñoles, 2003). Na ovelha, a cada 4 a 5 dias inicia-se uma nova onda folicular (Ginther *et al.*, 1995; Bartlewski *et al.*, 1998; Evans *et al.*, 2000), sendo normalmente referidas 2 a 4 ondas foliculares por ciclo éstrico. O folículo ovulatório desenvolve-se na última onda folicular do ciclo (Ginther *et al.*, 1995; Bartlewski *et al.*, 1999a). O número de ondas foliculares pode depender do estado reprodutivo das ovelhas que foram usadas nos diferentes estudos, da raça (mono-ovulatórias ou poli-ovulatórias) e da sua condição corporal (Noel *et al.*, 1993; Ravindra *et al.*, 1994; Ginther *et al.*, 1995; Viñoles *et al.*, 2002). Nas raças mais prolíficas, tais como a Finnish Landrace e a Rambouillé x Booroola, cerca de 50% de todos os folículos com dimensões ovulatórias existentes na penúltima onda folicular ovulam, juntamente com os folículos ovulatórios da última onda (Bartlewski *et al.*, 1999a; Gibbons *et al.*, 1999). Na ovelha, a selecção e dominância não são processos óbvios (Driancourt, 1991, 1994, Webb, 1999 *cits.* Evans *et al.*, 2000; Ravindra *et al.*, 1994; Fry, 1996 *cit.* Duggavathi *et al.*, 2005; Driancourt, 2001; Duggavathi *et al.*, 2003), pelo que a existência de uma onda folicular fortemente dominante, tal como se vê nas vacas, é pouco evidente (Scaramuzzi *et al.*, 1993; Driancourt, 2001; Rawlings *et al.*, 2003). Durante a época reprodutiva ocorrem ondas de crescimento folicular de uma forma regular. Estas ondas continuam durante o anestro, mas com menor duração em comparação com as ondas que ocorrem durante a época reprodutiva (Bartlewski *et al.*, 2000).

O mecanismo de recrutamento e selecção folicular e, consequentemente, o número de folículos destinados a ovular, é caracterizado pela relação entre factores de crescimento intrafolicular, factores metabólicos e o sistema de *feedback* do eixo hipotálamo-hipófise-

ovário (Scaramuzzi e Radford, 1983; Scaramuzzi *et al.*, 1993; Skinner *et al.*, 1987, Lobb e Dorrington, 1992, Monniaux *et al.*, 1994, Monget e Monniaux, 1995, Bao e Garverick, 1998 *cits.* Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2002; Viñoles, 2003; Hunter *et al.*, 2004; Webb *et al.*, 2007). Factores ambientais, tais como a alimentação, podem também influenciar o desenvolvimento folicular e a qualidade dos oócitos e portanto, a fertilidade e a prolificidade dos animais (Garnsworthy e Webb, 1999, Webb *et al.*, 1999ab, 2003 *cits.* Webb *et al.*, 2004).

Cada onda folicular é precedida de um aumento da concentração plasmática de FSH (Scaramuzzi *et al.*, 1993; Ginther *et al.*, 1995; Souza, 1998; Bartlewski *et al.*, 1999ab; Bartlewski *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2000; Fortune *et al.*, 2004; Duggavathi *et al.*, 2004), dando-se posteriormente uma redução da mesma devido ao *feedback* negativo do estradiol e da inibina produzidos nos folículos recrutados (Gibbons, 1997, Mihm, 1997 *cits.* Driancourt, 2001; Gibbons, 1997, *cit.* Webb *et al.*, 2004; Fortune *et al.*, 2001; Hunter *et al.*, 2004). Isto faz com que a FSH fique abaixo do limiar de selecção de mais folículos (Campbell *et al.*, 1995, Webb *et al.*, 1999a, Ginther *et al.*, 2001, *cits.* Webb *et al.*, 2004; Hunter *et al.*, 2004) e o folículo dominante passa a dispor apenas da LH para suportar o seu crescimento (Hunter *et al.*, 2004; Webb *et al.*, 2004), ou seja, passa a ser dependente da LH à medida que o folículo sofre maturação e a concentração de FSH diminui nas ovelhas (Campbell, 2003b *cit.* Hunter *et al.*, 2004; Webb *et al.*, 2004). A transformação de um folículo dependente das gonadotrofinas num folículo capaz de ovular requer uma concentração baixa, mas crítica, de FSH (Campbell, 1999 *cit.* Viñoles, 2003; Driancourt, 2001), variando esse limite entre ovelhas e entre folículos numa mesma ovelha (Picton, 1991, Fry, 1996 *cits.* Duggavathi *et al.*, 2005). Os folículos ovulatórios têm grandes quantidades de receptores de LH e FSH nas suas células da granulosa (Viñoles, 2003). Em qualquer fase do ciclo éstrico dos ovinos, assim que o presumível folículo dominante é detectado como maior do que os restantes folículos (diferença de 1 mm), ele tem já uma maior capacidade de produzir estradiol (Bjersing, 1972 *cit.* Bartlewski *et al.*, 1999a; Badinga *et al.*, 1992, Fortune, 1994, *cits.* Fortune *et al.*, 2004; Bodensteiner, 1996 *cit.* Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2002; Evans, 1997 *cit.* Rivera e Fortune, 2001; Fortune *et al.*, 2001). O estradiol, por *feedback* negativo, inibe a libertação da FSH. Assim, quando o folículo dominante e o subordinado de maior tamanho são comparados, a sua única diferença, além da pequena diferença do diâmetro, é a sua capacidade de produzir estradiol (Fortune *et al.*, 2001).

Tem sido sugerido que as concentrações de inibina e de FSH influenciam o número de ondas foliculares e que as concentrações de FSH controlam o intervalo entre elas (Ginther, 2002a, *cit.* Webb *et al.*, 2004; Bartlewski *et al.*, 2000). Pensa-se que a FSH actua especificamente nas células da granulosa para influenciar a viabilidade dos folículos

ovários e a sua capacidade para ovular (Hirshfield, 1979, Richards, 1980, Peters e McNatty, 1981, Monniaux *et al.*, 1983 *cits.* McNatty *et al.*, 1985).

Existe uma ligação clara entre o tamanho com que os folículos passam de sensíveis às gonadotrofinas a dependentes daquelas hormonas, e o tamanho com que são recrutados para ovular. À medida que os folículos se desenvolvem, vão adquirindo receptores de LH e FSH nas células da teca e da granulosa, respectivamente. Em resposta às gonadotrofinas, os folículos desenvolvem a capacidade de sintetizar progesterona e androgénios. No entanto, não são detectadas quantidades apreciáveis de estradiol até que os folículos tenham cerca de 0,5 mm de diâmetro (Scaramuzzi *et al.*, 1993). Com a quantidade de FSH correcta, os folículos aumentam a sua actividade de aromatase, produzindo estradiol em quantidades crescentes. No entanto, sem o suporte adequado de FSH, a actividade de aromatase não se mantém, a produção de estradiol diminui e o androgénio acumula-se no folículo, levando-o à atresia (Scaramuzzi e Campbell, 1990 *cit.* Viñoles, 2003; Driancourt, 2001).

A atresia folicular está correlacionada com um declínio na síntese de estradiol em conjunto com um aumento da produção de progesterona (Hsueh, 1984 *cit.* Viñoles, 2003) e por isso o desvio de tamanho entre o folículo maior e o segundo maior, também conhecido por “desvio folicular” (Ginther, 1966 *cit.* Fortune *et al.*, 2001), está associado a um aumento da concentração de LH e a uma redução do estradiol (Kulick, 1999, *cit.* Webb *et al.*, 2004). No entanto, a produção de estradiol não é, aparentemente, um pré-requisito para a dominância folicular (Driancourt, 2001).

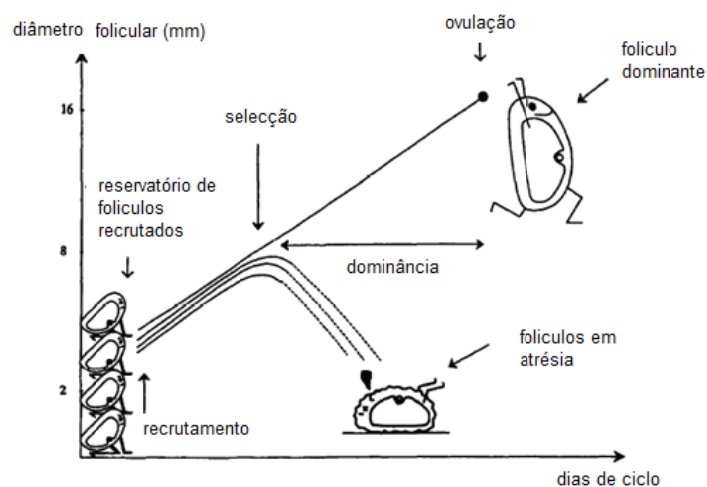


Figura 2: Eventos principais que ocorrem durante uma onda folicular (Adaptado de Driancourt, 2001)

2.2) Taxa de Ovulação

O número de oócitos libertados – taxa de ovulação – é muito variável dentro do rebanho e depende de vários factores como a raça, a estação do ano, a condição corporal (Allen, 1961, Gunn, 1975, 1979 *cits.* Haresign, 1981; Henderson, 1990; Downing e Scaramuzzi, 1991 *cit.* Viñoles *et al.*, 2002), a alimentação e o estado de saúde do animal (Henderson, 1990).

Uma baixa taxa de ovulação numa ovelha significa que existe menor probabilidade de ficar gestante (Henderson, 1990), sendo portanto a taxa de ovulação um factor determinante da eficiência reprodutiva. O número de oócitos libertados é determinado pelo mecanismo que controla a selecção de folículos ovulatórios. Assim, o aumento da taxa de ovulação pode ser consequência de um aumento no número de folículos que respondem às gonadotrofinas, e/ou um maior período sob níveis de FSH elevados que prolongam a janela de recrutamento (Viñoles, 2003).

A maioria das raças de ovelhas possui taxas de ovulação entre 1 e 2, encontrando-se a raça Merino Branco no grupo que apresenta taxa de ovulação de 1. No entanto, existem raças de ovelhas com 3 ou mais ovulações por ciclo (Scaramuzzi e Radford, 1983).

Raça	Origem	Taxa de ovulação	Referência
Merino Booroola	Austrália	$2,68 \pm 0,11$	Bindon <i>et al.</i> , (1978)
Dahman	Marrocos	$2,50 \pm 0,45$	Lahlou-Kassi e Marie (1981)
Finn	Finlândia / Rússia	$3,31 \pm 0,17$	Bradford <i>et al.</i> , (1971)
Hu Yang	China	$3,11 \pm 0,18$	Guo <i>et al.</i> , (1981)
Romanov	Russia	$2,86 \pm 0,23$	Bindon <i>et al.</i> , (1979)

Tabela 2: *Taxas de ovulação conhecidas de várias raças de ovelhas prolíficas (fonte: Scaramuzzi e Radford, 1983)*

3) Influência da nutrição na performance reprodutiva

Observam-se três tipos de influência da alimentação na taxa de ovulação:

- Um “efeito estático” referente à maior taxa de ovulação observada nas ovelhas mais pesadas quando comparada com as mais leves, ou seja, associado ao peso vivo por si só (Smith e Stewart, 1990 *cit.* Viñoles, 2003; Molle *et al.*, 1995). Conduz a uma diminuição da produção de estradiol que diminui o *feedback* negativo sobre o eixo hipotálamo-hipofisário, promovendo o aumento de FSH que, por sua vez, estimula a selecção e desenvolvimento de novos folículos (Viñoles, 2003).

- Um “efeito dinâmico” referente ao aumento da taxa de ovulação devido a aumentos no peso vivo e da condição corporal durante um curto período antes da cobertura (Smith e Stewart, 1990 *cit.* Viñoles, 2003; Molle *et al.*, 1995). Não está associado a alterações da capacidade de produção de esteróides nem aos mecanismos de *feedback*, mas sim a aumentos da leptina, insulina e glucose (Viñoles, 2003).

- Um efeito imediato ou agudo, no qual se verifica um aumento da taxa de ovulação após um curto período de suplementação, sem que o peso vivo ou a condição corporal se alterem (Pearse *et al.*, 1994).

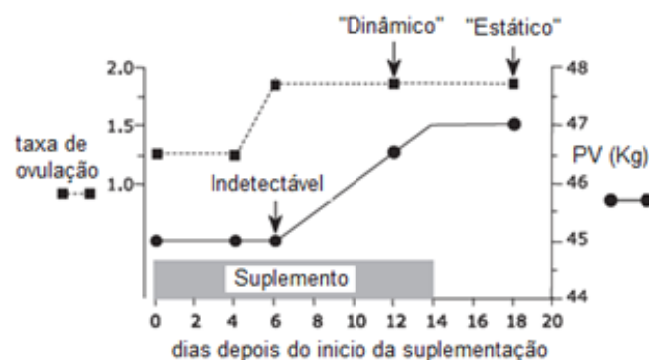


Figura 3: *Influência dos efeitos dinâmico e estático da nutrição na taxa de ovulação da ovelha (adaptado de Scaramuzzi et al., 2006).*

A nutrição afecta muitos aspectos da actividade reprodutiva das ovelhas, como por exemplo, a gametogénese, a idade à puberdade, a fertilidade, a taxa de ovulação, a sobrevivência embrionária e o intervalo entre o parto e a gestação seguinte (McDonald *et al.*, 2002; Rosa e Bryant, 2003; Johnson *et al.*, 2003). A relação entre a nutrição da ovelha e o crescimento e sobrevivência do embrião pode depender de interacções entre o genótipo, a fecundidade, o grau de restrição alimentar e a duração do mesmo (Rhind *et al.*, 1989a).

A primeira resposta ao nível nutricional é a existência ou não de actividade reprodutiva, ou seja, a nutrição tem inicialmente um efeito qualitativo sobre a fertilidade, actuando sobre o eixo hipotálamo-hipofisário que controla a ovulação, permitindo que esta ocorra ou bloqueando-a. Se a resposta for afirmativa o animal tem então que ajustar a performance reprodutiva (concretamente a taxa de ovulação) ao fornecimento nutricional - efeito quantitativo sobre a prolificidade (Scaramuzzi e Martin, 2008). Se bem que ainda alvo de controvérsia, o componente da dieta que parece mais influenciar a taxa de ovulação é a energia, particularmente aquela derivada da glucose. Contudo, a relação entre a função ovárica e os componentes da dieta permanece ainda por esclarecer.

Os rebanhos de ovelhas Merino postas à cobrição no fim da Primavera / início do Verão estão normalmente sujeitos a períodos de stress alimentar em ambas as fases de desenvolvimento folicular devido a variações sazonais na disponibilidade do alimento (Martin, 1992 *cit.* Nottle *et al.*, 1997b; Robinson *et al.*, 2006), o que pode influenciar a taxa de ovulação e a qualidade dos óocitos (Smith, 1991 *cit.* O'Callaghan *et al.*, 2000; Kiyma *et al.*, 2004; Robinson *et al.*, 2006). Assim, durante o período de preparação para a cobrição, no decurso desta e ao longo do primeiro mês de gestação devem evitar-se as variações bruscas na alimentação, já que se dá o risco de perturbar a entrada em cio das ovelhas e, posteriormente, aumentar a mortalidade embrionária (Jarrige, 1988).

O balanço energético fornece uma clara relação entre a nutrição e a reprodução (Tabela 3). Em alturas de stress nutricional, quer devido a uma grande procura endógena de nutrientes para a reprodução, quer devido à insuficiência de aporte nutricional, as reservas corporais de proteína, glicogénio e gordura são mobilizadas e actuam como suplemento metabólico da dieta (Lindsay *et al.*, 1993). Os efeitos do balanço energético negativo sobre a actividade reprodutiva na fêmea são primariamente ao nível do eixo hipotálamo-hipofisário, podendo ocorrer a inibição da libertação de GnRH, a redução da secreção de LH, e eventualmente anovulação e anestro (Scaramuzzi e Martin, 2008). Observa-se também hipocalcémia, hipoinsulinémia, supressão da IGF-I plasmática e aumento da GH, (Lindsay *et al.*, 1993; Wade, 2005 *cit.* Scaramuzzi *et al.*, 2006). O sistema hipotalâmico gerador de pulsos de GnRH parece ser mais sensível à privação nutricional nos animais monogástricos do que nos ruminantes. De facto, nos ruminantes a ovulação nunca é completamente suprimida pela subnutrição, mesmo quando esta é severa (Hafez, 1952, Allen, 1961 *cits.* Rhind, 1992). Nestes animais, a hipoglicémia é rara, a não ser quando induzida experimentalmente (Szymanski *et al.*, 2007), pelo que estes animais parecem protegidos contra a anovulação nutricional.

Nos animais com uma condição corporal adequada, os efeitos da suplementação nutricional parecem ter um efeito reduzido na secreção de GnRH e das gonadotrofinas. O balanço energético positivo leva ao aumento da leptina e insulina no sangue e ao aumento da taxa de entrada de glucose na célula. Estas alterações, aparentemente, afectam o ovário directamente e estão associadas com o aumento da foliculogénese e da taxa de ovulação na ovelha (Scaramuzzi *et al.*, 2006). O metabolismo hepático dos esteróides é também alterado nestas situações, modificando o mecanismo de *feedback* entre o ovário e o eixo hipotálamo-hipofisário, conduzindo ao aumento da foliculogénese.

Balanço Metabólico	Consequências metabólicas	Efeitos na reprodução
Balanço energético negativo	<ul style="list-style-type: none"> - Perda de peso - Depleção das reservas de gordura - Desgaste muscular - Hipoinsulinémia e hipoglicémia - Ácidos gordos não esterificados elevados - Ureia elevada - Leptina baixa 	<ul style="list-style-type: none"> - Inibição da secreção de GnRH pelo hipotálamo - Ausência de pulsos de LH - Baixa concentração de FSH - Inibição da foliculogénese - Estradiol baixo - Elevada sensibilidade ao <i>feedback</i> negativo - Anovulação - Anestro - Atraso na puberdade
Balanço energético nulo	<ul style="list-style-type: none"> - Manutenção do peso - Manutenção das reservas de gordura - Insulina e glicémia normais - Ácidos gordos não esterificados baixos - Ureia normal - Leptina normal 	<ul style="list-style-type: none"> - Secreção de GnRH pelo hipotálamo normal - Pulsos de LH normais - Concentração normal de FSH - Foliculogénese normal - Estradiol e inibina normais - <i>Feedback</i> negativo normal - Ovulação - Estro
Balanço energético positivo	<ul style="list-style-type: none"> - Ganho de peso a longo prazo - Aumento dos depósitos de gordura - Hiperinsulinémia e hiperglicémia - Ácidos gordos não esterificados baixos - Ureia normal ou aumentada se o azoto alimentar for elevado - Leptina elevada 	<ul style="list-style-type: none"> - Secreção normal de GnRH pelo hipotálamo - Pulsos de LH normais - Aumento da concentração de FSH - Foliculogénese aumentada - Redução no estradiol - Redução do <i>feedback</i> negativo - Estro - Taxa de ovulação natural máxima - Avanço na puberdade

Tabela 3: *Algumas das associações conhecidas entre o balanço energético e a reprodução (Scaramuzzi et al., 2006)*

O regime alimentar parece assim, afectar a secreção de gonadotrofinas, podendo assim ter efeito na ovulação (Adams, 1997 *cit.* Rosa e Bryant, 2003), na produção de progesterona, condicionando a taxa de gestação (Parr, 1987 *cit.* Rosa e Bryant, 2003), e no balanço entre a secreção de FSH e a sensibilidade da hipófise ao *feedback* do estradiol e da inibina, regulando a sazonalidade da reprodução (Boukhliq *et al.*, 1996).

Os efeitos da alimentação no desenvolvimento folicular e consequentemente, na taxa de ovulação, podem ser potencialmente mediados por alterações na concentração sanguínea de metabolitos (glucose, ácidos gordos não esterificados, aminoácidos, etc.), hormonas metabólicas (insulina, GH, etc), gonadotrofinas (LH e FSH), ou uma combinação de todos os anteriores que ajudam a manter a homeostasia corporal (Harman, 1991 *cit.* Blanche *et al.*, 2000; Rhind, 1992; Boukhliq *et al.*, 1996; O'Callaghan, *et al.*, 2000; Webb *et al.*, 2004; Robinson *et al.*, 2006; Scaramuzzi *et al.*, 2006).

Uma melhoria na alimentação no período pré-ovulatório aumenta o tamanho do folículo ovulatório e a capacidade do corpo lúteo resultante segregar progesterona (Bergfeld *et al.*, 1994, Rhodes *et al.*, 1995, Mackey *et al.*, 1999, Bossis *et al.*, 2000, Armstrong *et al.*, 2001 *cits.* Webb *et al.*, 2004; Robinson *et al.*, 2002 *cit.* Robinson *et al.*, 2006). As alterações induzidas numa série de hormonas metabólicas, através da alimentação, podem ser correlacionadas com alterações nas funções do ovário (Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2002; Viñoles, 2003; Webb *et al.*, 2004), ou seja, a regulação da síntese de esteróides, visto que a glucose e a insulina em conjunto diminuem a esteróidogénese folicular, sendo esta estimulada pela IGF-1 (Insulin Growth Factor – 1; Lindsay *et al.*, 1993; Scaramuzzi, 1999 *cit.* Viñoles *et al.*, 2005). A suplementação alimentar reduz a secreção de estradiol do folículo dominante permitindo que este mantenha a sua dominância por um maior período (Scaramuzzi *et al.*, 2006) e, reduzindo o *feedback* negativo sobre a libertação de FSH, permite que mais folículos sejam recrutados e entrem na fase pré-ovulatória (Viñoles *et al.*, 2002; Scaramuzzi *et al.*, 1993; Somchit *et al.*, 2007, Scaramuzzi *et al.*, 2006, Viñoles *et al.*, 2005).

No entanto, depois da ovulação, um elevado nível alimentar pode aumentar a taxa de metabolização da progesterona, reduzindo a sua concentração plasmática a níveis que podem comprometer a sobrevivência embrionária (Robinson *et al.*, 2002 *cit.* Robinson *et al.*, 2006).

3.1) Condição corporal e sua influência na taxa de ovulação

Uma boa condição corporal é fundamental para que os animais possam expressar a taxa de ovulação máxima geneticamente determinada e também para reposição das reservas corporais perdidas durante a gestação (Henderson, 1990). Uma rápida melhoria da condição corporal está normalmente associada a um aumento da taxa de ovulação e da prolificidade (Coop, 1966 *cit.* Boland *et al.*, 2001).

A melhor estratégia para alimentar as ovelhas antes da cobrição é permitir que elas ganhem progressivamente ou mantenham a CC, em vez de diminuir a sua CC e fazer flushing nas últimas 3 semanas antes da cobrição (Henderson, 1990).

Assim, as diferenças na taxa de ovulação associadas a diferentes condições corporais devem-se a diferenças no número de folículos potencialmente ovulatórios presentes na altura da regressão lútea, quando se inicia a selecção dos folículos ovulatórios (Rhind, 1986 *cit.* Rhind, 1992). No entanto, animais na mesma condição corporal podem encontrar-se em estados metabólicos diferentes, sendo assim importante, além da avaliação da condição corporal do animal num dado momento, conhecer também o sentido da variação, o que se consegue na prática através de avaliações frequentes da condição corporal (Caldeira, 1988).

4) Tremçoço

O tremçoço (*Lupinus ssp.*) é muito utilizado na alimentação dos ruminantes devido ao seu grande potencial de fornecimento de energia e proteína em quantidades necessárias às diferentes produções (Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2004; Ramalho, 2008).

Os centros geográficos de origem do tremçoço situam-se na bacia mediterrânica, no Norte e Centro de África e no continente Sul-Americano (Kurlovich *et al.*, 2002b). As várias espécies de *Lupinus* são hoje largamente cultivadas em zonas de clima temperado dos hemisférios Norte e Sul, estendendo-se a sua cultura desde a Rússia até à Austrália (Aguiler e Trier, 1978 *cit.* Filhó, 2004; Kurlovich *et al.*, 2002b). A maior parte das espécies de tremçoço utilizadas na alimentação dos animais inclui o *L. albus*, o *L. angustifolius* e o *L. luteus* (Barneveld, 1999; Kurlovich *et al.*, 2002b).

Os efeitos benéficos do tremçoço centram-se principalmente na contribuição da proteína como uma fonte de azoto para a síntese proteica pelos microrganismos do rúmen, mas possivelmente também devido a uma boa quantidade de energia metabolizável e um

menor distúrbio da digestão da fibra, que normalmente acompanha a fermentação do amido dos cereais (Lindsay, 1976, Johnsson, 1982, Dixon e Hosking, 1992 *cits.* Barneveld, 1999; Leury *et al.*, 1990), o que faz do tremoço um suplemento valioso na melhoria da performance reprodutiva das ovelhas (Lindsay, 1976, Johnsson, 1982 *cits.* Barneveld, 1999; Leury *et al.*, 1990).

O tremoço, ao conter concentrações elevadas de proteína e baixos teores de amido (Leng, 1990 *cit.* Brand *et al.*, 1997; Barneveld, 1999; Somchit *et al.*, 2007) fornece aos ruminantes níveis elevados de substratos energéticos, particularmente importantes para a gluconeogénese, permitindo o aumento das taxas de entrada de glucose na célula (Teleni, 1989 *cit.* Somchit *et al.*, 2007; Leng, 1990 *cit.* Brand *et al.*, 1997).

4.1) Composição química do tremoço

O tremoço branco (*Lupinus albus*) caracteriza-se por ter uma grande variabilidade dos teores de proteína, gordura e de alguns aminoácidos, nomeadamente dos limitantes, como a metionina (Kurlovich *et al.*, 2002a).

4.1.1) Hidratos de Carbono

O tremoço caracteriza-se por possuir na sua composição hidratos de carbono com propriedades únicas, com níveis insignificantes de amido, níveis elevados de polissacáridos não amiláceos solúveis e insolúveis e níveis elevados de oligossacáridos (Barneveld, 1999). Existe mais hemicelulose na fibra bruta do tremoço do que nas outras leguminosas, como as ervilhas e as favas, que têm maioritariamente celulose como principal componente da fibra (Reddy, 1983, Bach e Knudsen, 1997 *cits.* Barneveld, 1999). Esta maior proporção de hemicelulose resulta num padrão de fermentação menos susceptível de causar acidose láctica (Barneveld, 1999).

4.1.2) Proteína

A estrutura proteica do tremoço confere-lhe propriedades únicas. O armazenamento proteico é principalmente constituído por globulinas, o que sugere que o tremoço tem baixas propriedades emulsionantes ou seja, solubilidade, quando comparado com um alimento rico em albuminas (Adsule e Kadam, 1989 *cit.* Barneveld, 1999). O interesse desta leguminosa para a alimentação animal reside nos níveis elevados de proteína (quase sempre superiores

a 30%), facilmente degradável, pelo que fornecer grão de tremoço a ovelhas aumenta a digestibilidade da matéria orgânica (Lindsay, 1980 *cit.* Downing *et al.*, 1995). No entanto, cerca de 35% da proteína do tremoço escapa à degradação no rúmen e passa para o intestino – proteína by-pass (Hume, 1974 *cit.* Downing *et al.*, 1995; Lindsay *et al.*, 1993; Barneveld, 1999) o que, depende, em parte, dos métodos de preparação da semente. O nível de aminoácidos sulfurados é reduzido.

4.1.3) Lípidos

O tremoço branco é um grande fornecedor de energia sob a forma de gordura. No entanto, a gordura e a proteína do tremoço têm uma correlação negativa (em proporção) em que as variedades provenientes de vários locais mostram diferenças na acumulação de gordura e proteína (Kurlovich *et al.*, 2002a), como se pode observar na figura 4.

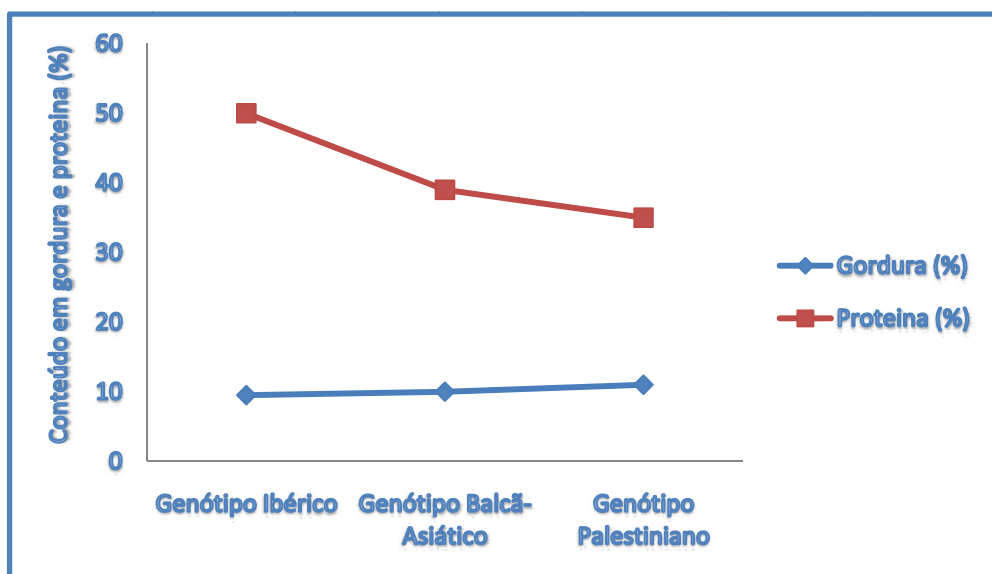


Figura 4: Variação na percentagem de proteína e gordura em sementes de tremoço branco (*L. albus*) de diferentes genótipos (adaptado de Kurlovich *et al.*, 2002a)

Valores de nutrientes e energia em três espécies de tremço (semente inteira)			
	<i>L. albus</i>	<i>L. luteus</i>	<i>L. angustifolius</i>
Matéria seca (%)	90,4 %	88,6 %	91%
Proteína Bruta (%)	37,4 %	37,4 %	32%
Fibra Bruta (%)	10,6 %	16,3 %	15,4 %
NDF (%)	17,6 %	34,3%	23,5%
Alcalóides (%)	0,02%	0,04%	0,02%
EM ovelhas (MJ/Kg)	12,5	n/a	12,2

Tabela 4: Composição química e valor nutritivo de três espécies de tremço (adaptado de Abreu et al., 2000 e www.lupins.org)

4.1.4) Factores anti-nutricionais

Os *Lupinus spp.* apresentam como factor limitante para a sua utilização a presença de factores anti-nutricionais, nomeadamente os alcalóides que, para além do sabor amargo que conferem ao tremço, podem tornar-se tóxicos se ingeridos em quantidades elevadas (Filhó, 2004).

Os factores anti-nutricionais são, normalmente, produtos do metabolismo secundário das plantas e actuam como mecanismos de defesa contra pragas e doenças (Haslam, 1983, Rosenthal, 1983 *cit.* Filhó, 2004). Podem estar na origem de alterações metabólicas graves nos animais que as ingerem, conduzindo a quebras de produtividade ou, em alguns casos, à morte. No entanto, o perigo de toxicidade é diminuído pela reduzida digestibilidade dos alcalóides e ainda por o seu consumo ser limitado pelo sabor amargo que confere ao tremço. Será necessária a ingestão de doses elevadas num curto espaço de tempo para que se verifiquem os sintomas (Filhó, 2004). Assim, quando uma planta tóxica é ingerida, a eliminação dessa toxicidade depende de factores nutricionais e fisiológicos dos animais (Lopez-Ortiz et al., 2004).

Os sinais de intoxicação por alcalóides consistem em nervosismo, falta de apetite, febre, salivação excessiva, dificuldades respiratórias, perda de controlo muscular, convulsões, coma e morte por paralisia muscular (Souza, 1983 *cit.* Filhó, 2004).

Podemos considerar alcaloidícas todas as plantas que contenham mais do que 0,01% de alcalóides totais na semente (Smith, 1976, *cit.* Filhó, 2004) e, assim sendo, todas as espécies do género *Lupinus* (incluindo as variedades doces) são normalmente

alcaloidícas (Filhó, 2004). Os maiores valores de alcalóides são atribuídos ao tremço cultivado em terras pouco férteis, deficientes em manganês e potássio, e onde os rendimentos das cultivares são baixos devido a uma época seca (Filhó, 2004). Por segurança, o conteúdo em alcalóides num alimento fornecido ao animal deve ser inferior a 0,06% da MS (McDonald *et al.*, 2002).

5) Suplementação alimentar no curto prazo – *Flushing*

O *flushing* é definido como o aumento, em cerca de 20 a 30% acima das necessidades de manutenção, do nível alimentar (proteico, energético ou de ambos) imediatamente antes da cobertura (Pearse *et al.*, 1994; Gunn, 1983 *cit.* Rhind, 1992; Jarrige, 1988). No entanto, a origem (Molle *et al.*, 1995; Landau, 1996, Branca, 2000 *cits.* Ocak *et al.*, 2006), o nível (Parr, 1987 *cit.* Ocak *et al.*, 2006; Rhind *et al.*, 1989a) ou o período da suplementação (Molle, 1997 *cit.* Ocak *et al.*, 2006) podem ter consequências críticas na eficiência reprodutiva da ovelha porque os requisitos de nutrientes para um crescimento folicular óptimo podem ser diferentes dos requisitos para o desenvolvimento embrionário (O'Callaghan e Boland, 1999 *cit.* Ocak *et al.*, 2006).

O *flushing*, seja de proteína ou de energia, melhora a performance reprodutiva (Reese, 1990 *cit.* Ocak *et al.*, 2006; Downing *et al.*, 1995; Molle *et al.*, 1995; Nottle *et al.*, 1997a; 1997b; El-Hag, 1998 *cit.* Ocak *et al.*, 2006) e tem sido desde há muito posto em prática (Clarke e Henry, 1999; Boland *et al.*, 2001; Abecia *et al.*, 2006) para aumento da taxa de ovulação nas ovelhas (Scaramuzzi, 1990 *cit.* Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2004; Leury *et al.*, 1990; Scaramuzzi *et al.*, 1993; Downing *et al.*, 1995; Boland *et al.*, 2001, Fuentes e Fuentes, 2006).

É provável que o fornecimento de energia a curto prazo esteja directamente envolvido no recrutamento e talvez, também, no crescimento folicular (Leury *et al.*, 1990; Scaramuzzi, 1990 *cit.* Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2004; Scaramuzzi *et al.*, 1993; Martin, 1994, Pomares, 1995 *cits.* Clarke e Henry, 1999; Gutierrez, 1997 *cit.* Boland *et al.*, 2001), visto que o *flushing* altera a concentração de algumas hormonas envolvidas naquele processo (Scaramuzzi *et al.*, 2006). No entanto, o *flushing* não aumenta o número de folículos pequenos, com menos de 2 mm de diâmetro e, por isso, parece que o nível de alimentação tem pouco ou nenhum efeito nas fases iniciais de crescimento e maturação foliculares (Haresign, 1981).

Se o peso das ovelhas que vão ser postas à cobrição não for o suficiente ou a condição corporal das mesmas for inferior a 3,5, é possível fazer um melhoramento dos resultados da cobrição através de *flushing* (Gunn, 1983 *cit.* Rhind, 1992; Jarrige, 1988). A ausência de resposta ao *flushing* nas ovelhas muito magras é, provavelmente, devida a apenas haver um grande folículo potencialmente ovulatório em qualquer uma das fases do ciclo (Rhind, 1992).

5.1) Suplementação com tremoço

A utilização mais frequente do tremoço na Austrália, em 1972, era sob a forma de grão dado como suplemento a ovelhas alimentadas com forragem de baixa qualidade (Carbon, 1972 *cit.* Barneveld, 1999).

A suplementação com tremoço tem tido efeitos positivos nos ruminantes, em termos de crescimento e de eficiência reprodutiva, quando comparados com a suplementação com grãos de cereais (Barneveld, 1999), pois têm sido verificados aumentos na taxa de ovulação das ovelhas suplementadas com tremoço, sem que ocorram alterações mensuráveis no seu peso vivo (Barneveld, 1999). Segundo vários autores, uma suplementação com tremoço 4 a 6 dias antes da ovulação em ovelhas, é suficiente para provocar uma resposta ovulatória completa (Knight *et al.*, 1975 *cit.* Scaramuzzi e Radford, 1983; Stewart e Oldham, 1986; Gherardi e Lindsay, 1982, Oldham e Lindsay, 1984, *cits.* Viñoles *et al.*, 2005; Lindsay *et al.*, 1993; Nottle *et al.*, 1997a; Clarke e Henry, 1999).

Este efeito resultará dos elevados teores em energia e/ou proteína, suficientes para aumentar a taxa de ovulação nas ovelhas (Lindsay, 1976, Nottle, 1985 *cits.* Barneveld, 1999; Stewart e Oldham, 1986; Lindsay *et al.*, 1993; Gherardi e Lindsay, 1982, Oldham e Lindsay, 1984, *cits.* Viñoles *et al.*, 2005). No entanto, o nível deste efeito depende de vários factores, incluindo a degradabilidade da proteína, a alimentação prévia, o peso vivo e a raça do animal (Nottle *et al.*, 1988). De salientar, que quando as pastagens têm teores elevados de azoto, adicionar tremoço à dieta pode levar ao excesso de azoto amoniacal da mesma, o que poderá aumentar as concentrações de ureia no sangue, o que, por sua vez, tem efeitos negativos na fertilidade (Valentine e Bartsch, 1987 *cit.* Barneveld, 1999).

Como resultado de uma série de experiências especialmente concebidas para separar os efeitos da proteína e da energia do tremoço, os investigadores descobriram que o efeito da suplementação com tremoço na taxa de ovulação pode ser explicado pelo aumento do suplemento de substratos energéticos (Knight, 1975, Lindsay, 1976, Nottle,

1985 *cits.* Leury *et al.*, 1990; Teleni, 1984, 1986 *cit.* Rhind, 1992; Nottle *et al.*, 1988), ou seja, concluíram que o efeito da proteína por si só na taxa de ovulação era reduzido (Rhind, 1992). Alguns estudos em laboratório têm demonstrado que os aumentos na taxa de ovulação são mais relacionados com aumentos na energia metabolizável do que na proteína (Rowe, 1983 *cit.* Leury *et al.*, 1990).

Um dos efeitos principais da suplementação com tremço é o aumento da concentração de glucose no fluido folicular dos pequenos folículos (menores que 3 mm) (Somchit *et al.*, 2007). Assim, o efeito do tremço pode ser tanto o de promover o crescimento o desenvolvimento de folículos que numa situação normal não ovulavam, ou de restaurar a capacidade ovulatória desses folículos (Nottle *et al.*, 1997b). Segundo Muñoz-Gutiérrez *et al.*, (2002), a suplementação com tremço diminui o número de folículos que sofrem atresia (os de 2-3 mm) sem que afecte os folículos maiores do que 3 mm. No entanto, as respostas são rapidamente reversíveis, sugerindo uma resposta a curto prazo do ovário a uma suplementação adicional (Knight, 1975 *cit.* . Scaramuzzi e Radford, 1983).

6) Indicadores metabólicos para avaliação do estado nutricional

As tecnologias modernas de análise de sangue permitem, de forma barata e simples, caracterizar o estado metabólico do animal, tornando possível avaliar a adequação dos planos alimentares para cada nível de produção esperado (Caldeira *et al.*, 1999).

De um modo geral, a capacidade de uma hormona para influenciar o metabolismo de um tecido depende dos seus níveis circulantes, da taxa de fornecimento da hormona ao tecido alvo, do número e afinidade dos receptores da hormona presentes e da resposta dos mecanismos pós-receptores à acção da hormona (Weekes, 1983, Collier, 1984 *cit.* Caldeira, 1995).

Os indicadores do estado energético do animal incluem as concentrações séricas ou plasmáticas de glucose, insulina, ácidos gordos não esterificados, glucagon, β -hidroxibutirato, triglicéridos e lípidos totais, sendo a glucose, a insulina e os ácidos gordos não esterificados os melhores indicadores (Blanche *et al.*, 2000; Caldeira *et al.*, 2007ab). Os indicadores do estado proteico incluem as concentrações séricas ou plasmáticas de albumina, globulinas, proteína total, ureia e creatinina, em que a albumina e a ureia são talvez os indicadores mais utilizados (Blanche *et al.*, 2000; Caldeira *et al.*, 2007ab).

6.1) Leptina

A leptina é uma hormona proteica produzida nos adipócitos (Daniel *et al.*, 2002; Viñoles, 2003), que actua directamente no hipotálamo para regular o nível de ingestão de alimento e todo o balanço energético. Esta hormona influencia toda a homeostasia da glucose no corpo e a acção da insulina (Cunningham *et al.*, 1999, Marie *et al.*, 2001 *cits.* Viñoles *et al.*, 2005). A sua concentração plasmática é sensível a alterações de curto prazo da ingestão de alimento, variando com alterações agudas dessa mesma ingestão (aumenta 2 a 8 horas depois das refeições), e está correlacionada com a gordura corporal das ovelhas (Dagago-Jack, 1996, McGregor, 1996 *cits.* Clarke e Henry, 1999; Chilliard, 1998 *cit.* Blanche *et al.*, 2000; Daniel *et al.*, 2002; Viñoles, 2003; Scaramuzzi *et al.*, 2006). Quanto maiores as reservas corporais de energia maior a concentração de leptina (Blanche, 2000; Scaramuzzi *et al.*, 2006).

Admite-se que a leptina seja um sinal metabólico e um potente factor de saciedade (Campfield, 1995, Halaas, 1995 *cit.* Clarke e Henry, 1999) que regula os efeitos do estado nutricional na função reprodutiva (Friedman, 1998 *cit.* Nagatani *et al.*, 2000; Clarke e Henry, 1999; Keisler, 1999 *cit.* Daniel *et al.*, 2002; Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2002; Viñoles, 2003; Webb *et al.*, 2004). Tem uma acção directa ao nível do folículo ovárico (Considine, 1996 *cit.* Clarke e Henry, 1999; Clarke e Henry, 1999; Nagatani *et al.*, 2000; Boland *et al.*, 2001; Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2002; Viñoles, 2003; Scaramuzzi *et al.*, 2006), regulando a dimensão do folículo e, possivelmente a qualidade do oócito (Boland *et al.*, 2001). A energia da dieta poderá estimular directamente o recrutamento e selecção foliculares, podendo a leptina actuar como mediador (Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2002). A regulação da actividade ovárica pela leptina pode dar-se, também, por acção indirecta, através do seu efeito sobre a secreção da hormona do crescimento (GH) ou da prolactina, que podem ter um efeito indirecto nas gónadas (Adashi, 1995, Linzer, 1995 *cits.* Clarke e Henry, 1999; Nagatani *et al.*, 2000). Além disso, a leptina inibe a interacção entre as gonadotrofinas e a insulina (Webb *et al.*, 2004). A leptina inibe a secreção de estradiol e estimula a foliculogénese durante a fase folicular do ciclo éstrico (Kendall, 2004 *cit.* Scaramuzzi *et al.*, 2006).

Num ambiente pobre em leptina (baixa condição corporal e baixa ingestão de alimento) a função do ovário é ditada pelas gonadotrofinas e pela razão insulina/IGF-I. Num ambiente com leptina moderada a elevada (elevada condição corporal e elevada ingestão de alimento) o ovário é impedido de sobre-produzir estradiol devido à inibição da leptina (Daniel *et al.*, 2002; Viñoles, 2003).

6.2) Indicadores do estado energético do animal

6.2.1) Glucose e Insulina

Os principais precursores da glucose no ruminante alimentado com uma dieta equilibrada são (Bergman, 1973, Martin *et al.*, 1973, McDowell, 1983, Fahey e Berger, 1988 *cits.* Caldeira, 2005):

- O propionato proveniente do tracto gastro-intestinal;
- Os aminoácidos de origem alimentar e os oriundos da renovação da proteína corporal;
- O lactato resultante da glicólise no músculo, cérebro e eritrócitos,
- O glicerol libertado na hidrólise dos triglicéridos.

A insulina é uma hormona peptídica constituída por 51 aminoácidos, que desempenha um papel essencial na regulação integrada dos metabolismos glucídico e lipídico (Campos, 1998). É segregada pelo pâncreas, em resposta a um teor de glucose sanguínea elevado (Caldeira, 1995; Campos, 1998; Caldeira *et al.*, 2007a). Está positivamente correlacionada com a energia da dieta e sugere-se que esta hormona é o factor chave na regulação dos efeitos da ingestão de alimento na função ovárica (Armstrong *et al.*, 2001). Alterações na entrada de glucose nas células do ovário, causadas pela insulina, influenciam a função folicular, o que sugere um papel importante da insulina no mecanismo dos efeitos nutricionais na foliculogénese da ovelha (Downing e Scaramuzzi, 1997; Williams *et al.*, 2001).

O tipo de alimento pode condicionar a concentração sanguínea de glucose já que, por exemplo, algum amido de grãos de cereais pode escapar à fermentação ruminal levando a que quantidades significativas de glucose sejam absorvidas no intestino (Lindsay e Leat, 1975, Chilliard, 1985 *cits.* Caldeira, 1995; Jarrige, 1988), fazendo com que ruminantes alimentados com dietas ricas em grãos de cereais apresentem frequentemente glicémias superiores às observadas em animais com dietas à base de forragem (Jenny e Poland, 1975 *cit.* Caldeira, 1995). Valores baixos de glucose podem indicar níveis reduzidos de fornecimento alimentar ou da neoglucogénese, por carência de precursores glucogénicos, em fases de maiores necessidades de glucose (ex. fim da gestação e início da lactação), sendo típicos de quadros de cetose ou toxémia da gestação (Caldeira, 2005). Animais em balanço energético negativo prolongado apresentam também, por vezes, glicémias altas denunciando um descontrolo da homeostasia deste parâmetro. Valores elevados de glucose indicam geralmente fenómenos de resistência à insulina, frequentes em animais em condição corporal excessiva, ou quadros de stress (Caldeira, 1995; 2005).

Segundo alguns autores, a infusão de glucose pode aumentar a taxa de ovulação (Downing *et al.*, 1995) mas a qualidade embrionária pode ser dramaticamente reduzida (Furnus, 1996, Yaakub, 1997 *cit.* Boland *et al.*, 2001). Não é bem clara a razão das concentrações elevadas de glucose terem um efeito tão deletério no embrião, mas pode dever-se a interacções entre a insulina, a glucose e as proteínas transportadoras de glucose durante o início do desenvolvimento embrionário (Boland *et al.*, 2001). Moley (1996 *cit.* Boland *et al.*, 2001) sugere que as elevadas concentrações de glucose podem alterar a actividade do ciclo de Krebs resultando num atraso do desenvolvimento embrionário.

Glucose	Kaneko <i>et al.</i> , 1977 <i>cit</i> Caldeira, 2005	2,78 – 4,40
	Mollereau <i>et al.</i> , 1987 <i>cit</i> Caldeira, 2005	3,00 – 7,30
	Kahn & Line, 2005, <i>cit</i> Caldeira 2005	2,40 – 4,50
Insulina	Caldeira, 1995	5,00 – 40,00

Tabela 5: Valores de concentrações séricas ou plasmáticas de glucose (mmol/L) e de insulina (μ UI/ml) em ovelhas

As concentrações plasmáticas de glucose mostram uma variação limitada independentemente das alterações da condição corporal e do nível de ingestão. Estas concentrações podem contribuir para avaliação do estado energético, complementando, assim, a informação da insulina (Caldeira *et al.*, 2007a).

As concentrações de insulina exibem variações diárias mas também variações durante o ciclo éstrico com um aumento significativo durante o período pré-ovulatório (McCann e Hansel, 1986, Armstrong *et al.*, 2001 *cits.* Webb *et al.*, 2004). O estradiol é o candidato principal para a mediação destas alterações, visto ser segregado pelo folículo dominante e estimular a expressão do mRNA que codifica para a insulina, bem como a sua secreção pelo pâncreas, em muitas espécies (Morimoto, 2001 *cit.* Webb *et al.*, 2004). Alguns autores referem que o padrão de secreção da insulina nos ovinos é bifásico, sendo a fase inicial rápida e associada a uma queda moderada da concentração de glucose plasmática (Basset, 1974; Lindsay, 1977 *cit.* Caldeira, 1988). A segunda fase, mais prolongada, de 3 a 6 horas após a refeição, está associada a uma hiperglicémia coincidente com o aumento da absorção de produtos da digestão (Caldeira, 1988). A secreção de insulina (Trenkle, 1970, Basset, 1971, 1974a, Riis, 1983b, McCann 1986, 1989, 1992 *cits.* Caldeira, 1995) aumenta rapidamente em relação à absorção de nutrientes do tracto gastro-intestinal, referindo

mesmo Basset (1974a, *cit.* Caldeira, 1995) que a insulina é a hormona que apresenta a resposta quantitativa mais importante à absorção de nutrientes energéticos (Caldeira, 1995).

6.2.2) Ácidos Gordos Não Esterificados

Os ácidos gordos livres (AGL) ou ácidos gordos não esterificados (AGNE) têm origem na hidrólise dos triglicéridos depositados nos adipócitos, sendo libertados para a corrente sanguínea, onde são transportados pela albumina (Boyer 1975, Khoo, 1976 *cit.* Caldeira, 1988; Caldeira, 2005). Esta proteína plasmática confere aos AGNE a solubilidade necessária para poderem circular no sangue (Spector *et al.*, 1969 *cit.* Caldeira, 2005), funcionando como a sua transportadora (Robinson, 1964, Baldwin, 1971, Vernon, 1983, Chilliard, 1985, Rémésy, 1986 *cit.* Caldeira, 1988; Metz *et al.*, 1973. Murray, 1988, Ganong, 1991 *cits.* Caldeira, 2005).

Uma diminuição significativa na ingestão de alimento leva a um aumento dos AGNE (Caldeira *et al.*, 2007a). Este aumento da concentração sérica de AGL tem sido sistematicamente verificado em animais em balanço energético negativo e utilizado em muitos trabalhos como indicador do estado nutricional dos animais (Caldeira, 1988; Caldeira e Vaz Portugal, 1991; Annison 1960; Russel, 1967, 1969, 1977, Caldeira, 1991 *cits.* Caldeira, 1995; Chilliard *et al.*, 1987; Landau *et al.*, 1991; Cameron e Cienfuegos-Rivas, 1994 *cits.* Caldeira, 2005). Por outro lado, os seus valores basais identificam animais em balanço energético positivo, sem contudo discriminar a grandeza desse balanço positivo (Caldeira, 1995).

Os AGNE no sangue diminuem logo após a refeição ser iniciada, aumentando depois para um valor máximo imediatamente antes da refeição seguinte (Russel, 1967; Fredrickson, 1967; Steffens, 1968 *cits.* Caldeira, 1988), pelo que a sua quantificação deverá ser realizada em amostras de sangue recolhidas antes da primeira refeição diária dos animais.

AGNE	Balanço energético positivo ou nulo	< 200
	Balanço energético negativo	500 – 700
	Balanço energético negativo com mobilização forte	> 1000

Tabela 6: Valores de concentrações séricas de AGNE ($\mu\text{mol/L}$) em ovelhas. *Adaptado de Caldeira, 2005.*

Assim, níveis elevados de AGNE indicam um balanço energético negativo e, em contraste, níveis baixos indicam um balanço positivo ou nulo (Caldeira *et al.*, 2007a).

6.3) Indicadores do status proteico do animal

6.3.1) Ureia

A ureia presente na circulação sanguínea tem como precursor a amónia, a qual tem várias origens que interessa conhecer de modo a interpretar correctamente as variações daquele metabolito (Caldeira, 1995; 2005):

- No retículo-rúmen em resultado:
 - Da desaminação dos aminoácidos após a hidrólise da proteína alimentar pela população microbiana;
 - Da hidrólise da ureia reciclada para o retículo-rúmen, ou eventualmente veiculada na dieta;
 - Da degradação da própria proteína microbiana;
- Noutros tecidos do organismo, nomeadamente no fígado, em resultado do catabolismo de aminoácidos, de ácidos nucleicos e de outros compostos azotados.

No ruminante alimentado, um dos principais factores que influencia a concentração de ureia no sangue é a quantidade de proteína ou de azoto na dieta (Madsen, 1983b, Roseler *et al.*, 1993 *cits.* Caldeira, 2005; Hoffman *et al.*, 2001) ou, mais concretamente, a quantidade de compostos azotados absorvidos do tracto gastro-intestinal (Payne e Payne, 1987 *cits.* Caldeira, 2005).

É também fundamental a relação energia: proteína da dieta. Na presença de energia suficiente, a amónia é convertida em proteína microbiana. Quando a energia não é suficiente, os microorganismos não conseguem realizar a síntese proteica, sendo a amónia absorvida pela parede ruminal e transportada até ao fígado onde é convertida em ureia (Caldeira, 2005).

Outro aspecto importante do metabolismo das ovelhas é que uma concentração elevada de ureia no sangue (entre 15,8 e 23,2 mg/dl) está associada a efeitos deletérios no início do desenvolvimento embrionário (Bishonga, 1994 *cit.* Cannas *et al.*, 1998).

UREIA	Kaneko et al., 1977	2,86 – 7,14
	Mollereau et al., 1987	2,20 – 7,40
	Kahn & Line, 2005	3,70 – 9,30

Tabela 7: Valores de concentrações séricas de ureia (mmol/L) em ovelhas. *Adaptado de Caldeira, 2005.*

A concentração sérica ou plasmática de ureia é, assim, reconhecidamente um bom indicador do estado proteico do animal, permitindo corrigir eventuais carências ou excessos de proteína na dieta, desequilíbrios entre a quantidade de energia e de proteína ingeridas ou relações inadequadas entre a proteína degradável e não degradável no retículo-rúmen (Caldeira, 2005; Caldeira *et al.*, 2007a).

6.3.2) Albumina

A albumina é a proteína mais abundante no sangue, é sintetizada no fígado e a sua concentração sérica é utilizada como indicador da função hepática e do estado nutricional (Kaneko, 1997 *cit.* Caldeira, 2005). A albumina constitui uma reserva importante de proteína lábil, a que o animal recorre em situações de carência nutricional, e assegura funções de proteína de ligação e transporte de outras moléculas na circulação sanguínea, nomeadamente dos AGNE e de algumas hormonas (Kaneko, 1997 *cit.* Caldeira, 2005). Também é muito importante na manutenção da regulação osmótica corporal. Portanto, algumas flutuações nos níveis de albumina podem ocorrer, mas a manutenção dos níveis normais deve ser restabelecida assim que os aminoácidos estejam disponíveis (Kaneko, 1997, Moorby, 2002 *cits.* Caldeira *et al.*, 2007a).

As concentrações de albumina podem detectar e quantificar alterações a longo prazo no fornecimento de proteína com bastante exactidão mas não detectam alterações a curto prazo no fornecimento de proteína (Caldeira *et al.*, 2007a).

ALBUMINA	Kaneko et al., 1977	24,0 – 30,0
	Mollereau et al., 1987	27,0 – 45,0
	Kahn & Line, 2005	26,7 – 36,8

Tabela 8: Valores de concentrações séricas de albumina (g/L) em ovelhas. *Adaptado de Caldeira, 2005.*

III. **MATERIAIS E MÉTODOS**

O trabalho aqui apresentado foi realizado nas instalações da Unidade de Recursos Genéticos, Reprodução e Melhoramento Animal do L-INIA, na quinta da Fonte Boa, no Vale de Santarém.

Neste ensaio foram utilizadas 45 ovelhas de raça Merino Branco, múltiparas, com idades compreendidas entre os 5 e os 7 anos, e 5 carneiros da mesma raça existentes no efectivo da Quinta da Fonte Boa.



Figura 5: *Animais utilizados no ensaio e sala de ensaio*

1) **Delineamento experimental**

As 45 ovelhas foram divididas aleatoriamente em 3 grupos de 15 animais cada, sujeitos a diferentes suplementações:

- GC – grupo controle suplementado com dieta sem tremçoço
- GT400 – grupo suplementado com 0,4 kg de tremçoço
- GT600 – Grupo suplementado com 0,6 kg de tremçoço

A condição corporal (CC) média dos animais dos grupos GC e GT600 em D0 era de $2,48 \pm 0,06$ e do grupo GT400 era de $2,50 \pm 0,00$ ($P < 0,05$). A média das idades de cada um dos três grupos era de 6 anos. Quanto ao peso vivo (PV), as médias de cada grupo também

não foram diferentes entre si, e eram respectivamente de $51,80 \text{ kg} \pm 0,81$, $50,50 \text{ kg} \pm 0,85$, e de $50,70 \text{ kg} \pm 2,62$, para os grupos GC, T400 e T600.

O ensaio decorreu durante o mês de Junho de 2009, e as actividades foram calendarizadas de acordo com a tabela seguinte (Tabela 9):

D -5					Metab.
D -4					
D -3					
D -2					
D -1					
D 0				Habituação ao tremoço	
D 1					
D 2					
D 3					
D 4					
D 5					
D 6					
D 7					
D 8					
D 11					
D 14					
D 15					
D 25					
D 26					
D 28					

Tabela 9: *Calendário das actividades realizadas no ensaio (Metab. = recolhas de sangue para doseamento de albumina, ureia, AGNE, glucose, insulina)*

No final do período de sincronização do estro foram abatidas 5 ovelhas de cada grupo para a realização de análises que não serão apresentadas nesta dissertação.

2) Avaliação da condição corporal e pesagem dos animais

A pesagem foi realizada numa balança Portos PP50 e a condição corporal avaliada pela palpação da região lombar do animal e categorizada por pontos, meios e quartos de ponto, segundo a escala de Russel *et al.* (1969; Anexo I)

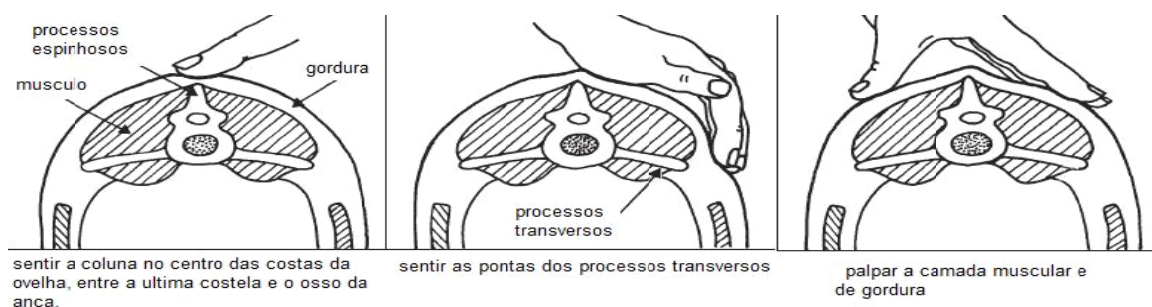


Figura 6: *Avaliação da condição corporal por palpação da região lombar (adaptado de Thompson e Meyer, 1994)*

A pesagem e a avaliação da condição corporal de cada um dos animais iniciaram-se no dia 5 de Março de 2009 e desde essa data até ao início do ensaio, realizaram-se de 15 em 15 dias, de forma a garantir a presença de 45 ovelhas com uma CC média de 2,5 em D0. A CC dos animais foi novamente avaliada em D6 e o peso em D11.

3) Alimentação

Após a primeira avaliação da CC e pesagem, em Março de 2009, foram formados grupos de acordo com a CC dos animais. A cada grupo foi fornecida uma quantidade de dieta ajustada à evolução da CC necessária para a obtenção de uma pontuação de 2,5, sendo as quantidades de alimento reajustadas sempre que a CC era avaliada. A dieta deste período de preparação compunha-se de alimento composto O3, fabricado na Quinta da Fonte Boa (Tabela 10) e feno de azevém.

	Matérias-primas (%)					
	Milho amarelo	Trigo	Cevada	Bagaço de Soja 42%	Bagaço de Girassol	Outros*
Alimento composto O3	18,5	23,0	20,0	19,5	14,0	5,0

Tabela 10: *Composição do alimento composto O3 (*: carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, bicarbonato de sódio, sal marinho, avomix Ovelhas e cabras).*

A composição nutricional dos alimentos da dieta é referida na tabela seguinte:

	MS (g/100 g)	EM (MJ/Kg)	PB (g/100 g)	GB (g/100 g)	FB (g/100 g)	Cinzas (g/100 g)	Dig.MO (%)
Alimento composto O3	89,00		17,30	1,20	8,10	6,50	
Feno de Azevém	89,40	7,89	14,60		21,40	14,30	73,80

Tabela 11: *Composição nutricional dos alimentos fornecidos antes do início do ensaio para obtenção de CC de 2,5 em todos os animais.*

Dezoito dias antes do início do ensaio, os animais foram divididos aleatoriamente por três grupos (cada grupo com uma CC média de 2,5), passando a receber 0,200 Kg de alimento composto O3 e 1 kg de feno de azevém por animal e por dia. A água era fornecida *ad libitum*. Durante esse período o alimento composto passou a ser fornecido na sala de ordenha onde iria ser feita a suplementação, para que os animais se habituassem ao dispositivo de distribuição individual de alimento. Nos últimos cinco dias deste período (D-4 a D0) foi feita a habituação ao tremço nos animais dos grupos GT400 e GT600 e procedeu-se ao aumento progressivo da proteína bruta e da energia metabolizável fornecidas a todos os animais (Tabela 12). Assim, o alimento composto O3 foi substituído por uma mistura de cevada, bagaço de soja e bagaço de girassol nos animais do grupo GC e uma mistura de cevada e de tremço aos animais dos grupos GT400 e GT600. As quantidades fornecidas foram aumentando diariamente.

GRUPOS	DIAS	Matérias-primas (kg/dia/animal)							PB na dieta diária (g na MS)	%PB na MS	EM na dieta diária (MJ na MS)
		Cevada	Bag. Soja	Bag. Girassol	Tremoço	O3	Feno de Azevém	TOTAL			
GRUPO CONTROL	D-18 a D-5	0	0	0	0	0,200	1,000	1,200	181,120	17,070	10,010
	-4	0,113	0,057	0,080	0	0		1,250	201,390	18,080	10,470
	-3	0,186	0,075	0,132	0	0		1,393	229,580	18,530	11,940
	-2	0,259	0,093	0,184	0	0		1,536	257,770	18,890	13,400
	-1	0,332	0,111	0,236	0	0		1,679	285,960	19,190	14,860
	0	0,405	0,129	0,288	0	0		1,822	314,160	19,440	16,330
GRUPO T400	D-18 a D-5	0	0	0	0	0,200	1,000	1,200	181,120	17,070	10,010
	-4	0,050	0	0	0,100	0		1,150	180,400	17,520	9,740
	-3	0,075	0	0	0,160	0		1,235	200,620	18,130	10,790
	-2	0,100	0	0	0,220	0		1,320	220,840	18,660	11,840
	-1	0,125	0	0	0,280	0		1,405	241,060	19,120	12,900
	0	0,150	0	0	0,340	0		1,490	261,280	19,530	13,950
GRUPO T600	D-18 a D-5	0	0	0	0	0,200	1,000	1,200	181,120	17,070	10,010
	-4	0,050	0	0	0,100	0		1,150	180,400	17,520	9,740
	-3	0,075	0	0	0,200	0		1,275	212,700	18,600	11,300
	-2	0,100	0	0	0,300	0		1,400	245,000	19,490	12,870
	-1	0,125	0	0	0,400	0		1,525	277,300	20,220	14,440
	0	0,150	0	0	0,500	0		1,650	309,600	20,850	16,010

Tabela 12: Composição da dieta fornecida desde a constituição dos grupos até ao final do período de habituação

Durante o período de suplementação (D1 a D6) foi fornecida aos animais uma quantidade fixa de alimento (Tabela 13). Aos animais do grupo GC foi fornecida uma mistura de cevada, bagaço de girassol e bagaço de soja e aos animais dos grupos GT400 e GT600 uma mistura de cevada e de *L. albus*, nas quantidades indicadas na Tabela 13. As dietas fornecidas aos grupos GC e GT600 foram formuladas de forma a serem isoproteicas e isoenergéticas.

	Matérias-primas (kg/dia/animal)					MS (kg/animal/dia)	PB na dieta diária (g na MS)	%PB na MS	EM na dieta diária (MJ na MS)	% de Alcalóides
	Cevada (kg)	B. Soja (kg)	B. Girassol (kg)	Tremoço (kg)	Feno (kg)					
GC	0,480	0,150	0,341	0,000	1,000	1,747	344,020	19,690	17,860	0,400
GT400	0,200	0,000	0,000	0,400	1,000	1,437	283,600	19,740	15,290	
GT600	0,200	0,000	0,000	0,600	1,000	1,621	344,000	21,230	17,860	

Tabela 13: Composição da dieta fornecida durante o período experimental (D1 a D6) aos três grupos em ensaio.

As dietas foram repartidas em 2 refeições diárias, às 9h e 16h, e o feno (1 kg / animal) foi distribuído depois da 2ª refeição.

No fim do período de suplementação substituíram-se as matérias-primas individuais pelo alimento composto O3, cuja quantidade foi diminuindo diariamente até 0,400 Kg / dia para evitar qualquer stress alimentar. A distribuição diária de 1 kg de feno de azevém foi mantida durante todo este período.

4) Controlo da actividade reprodutiva

Todas as 45 ovelhas foram sujeitas a um tratamento de sincronização do estro através da aplicação de esponjas vaginais impregnadas com 40 mg de acetato de fluorgestona (Chrono-Gest®, Intervet) durante 6 dias (D1 ao D6) e a administração por via intramuscular de 7,5 mg de PGF_{2α} (Estrumate – Schering – Plough) a cada ovelha no dia anterior à remoção das esponjas.

Vinte e quatro horas depois da remoção das esponjas, e a cada 6 horas, teve início o despiste deaios e a cobertura por monta natural. Para este efeito foram usados 5 carneiros da raça Merino Branco que se encontravam separados dos grupos das fêmeas. O carneiro detectava a fêmea em cio e procedia logo à sua cobertura, sendo cada fêmea coberta duas vezes, logo que era detectado o cio e no período de despiste seguinte. Esta detecção deaios realizou-se num parque à parte. Dezassete dias depois (D26) os machos foram reintroduzidos de forma a cobrirem as ovelhas que pudessem não ter ficado gestantes.

5) Recolha de amostras de sangue e métodos analíticos de doseamento

As amostras para o doseamento dos indicadores metabólicos glucose, ureia, albumina, insulina e ácidos gordos não esterificados (AGNE) foram colhidas de 10 animais por grupo, num total de 30 animais nos dias D-5, D2, D4, D6 e D14, antes da primeira refeição do dia. Todas as recolhas foram realizadas nos mesmos 10 animais de cada grupo.

As amostras de sangue para a obtenção de soro foram recolhidas de uma das veias jugulares com seringas S-Monovett® Serum Z/9 mL e agulhas Terumo 19G 1,1'. De seguida o sangue foi refrigerado a 4° C durante 2 horas, após o que foi centrifugado a 2000 r.p.m. durante 20 minutos. Após a centrifugação, o soro foi separado para tubos Eppendorf, que

foram devidamente etiquetados (número do animal e data da recolha) e guardados a -20 °C para posterior análise.

A determinação da concentração sérica de ureia, glucose e albumina decorreu no laboratório de análises clínicas Prof. Dr. Braço Forte da Faculdade de Medicina Veterinária (UTL) recorrendo a um auto analisador (Kone Optima No. 981475).

O doseamento dos AGNE foi feito manualmente com um kit comercial (Wako Chemicals YSA, Inc., USA) na Faculdade de Medicina Veterinária (UTL).

A insulina foi doseada pelo método RIA na Unidade de Recursos Genéticos, Reprodução e Melhoramento Animal do L-INIA, utilizando um kit comercial (Insulina CT RIA, Millipore, DSL, MP, Mercodia, Suécia). Esta hormona foi doseada no plasma em amostras de sangue recolhidas da veia jugular usando seringas MonovettNH4 Heparina da Ferftedt.

6) Indicadores reprodutivos

Foram avaliadas as taxas de fertilidade, de prolificidade e a taxa de partos duplos, definidas como se segue:

- Taxa de fertilidade: (Número de ovelhas paridas / Número de ovelhas cobertas) X 100
- Taxa de prolificidade: (Número de borregos nascidos / Número de ovelhas paridas) X 100
- Taxa de partos duplos: Número de partos duplos / Número total de partos

Avaliou-se também o intervalo entre a remoção das esponjas e o cio, bem como o peso médio dos borregos nascidos em cada grupo.

7) Tratamento estatístico

Os indicadores reprodutivos, com excepção do peso médio dos borregos e do intervalo entre a remoção das esponjas e o cio, foram analisados pelo teste do Qui². As excepções referidas foram analisadas por análise de variância (ANOVA). Os indicadores metabólicos (glucose, insulina, AGNE, ureia e albumina), a ingestão voluntária de alimento, o PV e a CC foram analisados por Análise de Variância para medidas repetidas. O limiar de significância utilizado em todos os testes foi de 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa STATISTICA para Windows, StatSoft, Inc. (2000).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1) Análise da ingestão voluntária de alimento

Durante o período experimental foram registadas as ingestões diárias de cada animal (Figura 7).

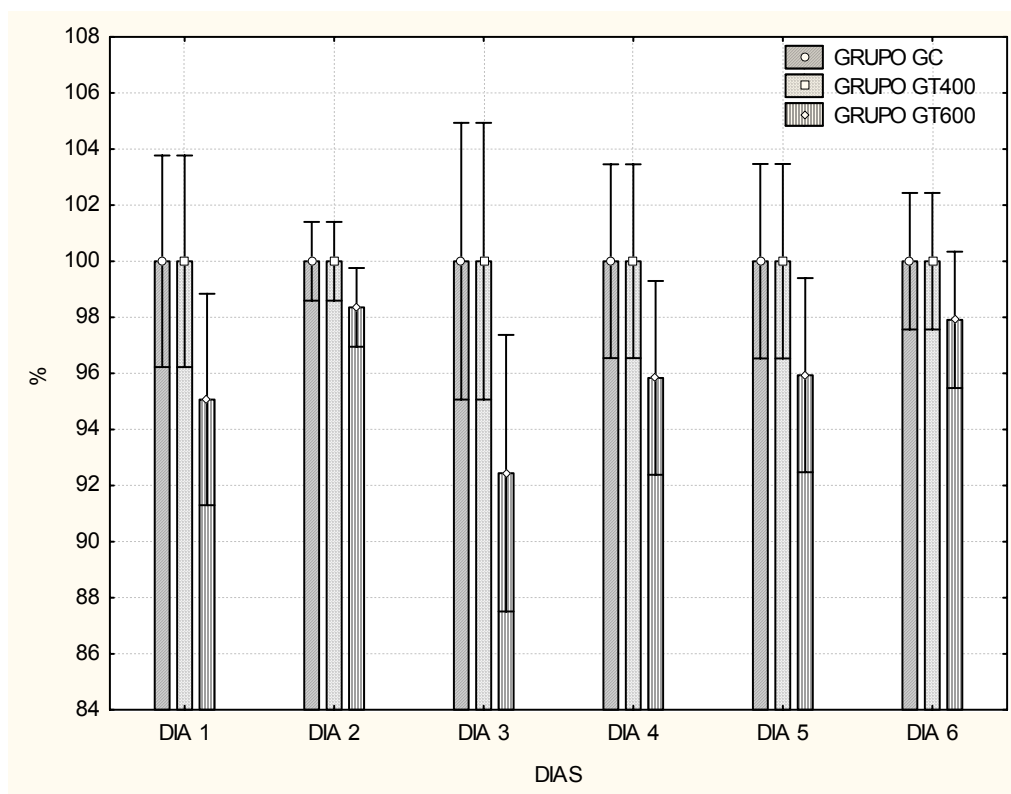


Figura 7: *Ingestão voluntária diária de alimento (média \pm erro padrão) em cada um dos grupos*

Os animais do grupo controlo (GC) e do grupo GT400 ingeriram a totalidade do alimento disponibilizado diariamente, enquanto as ingestões dos animais do grupo GT600 foram mais variáveis e ligeiramente inferiores (Tabela 14, $P=0,054$, Tabela I, Anexo II). O efeito do factor tempo e da sua interacção com o factor grupo não foram significativos ($P=0,35$ e $P=0,343$, Tabela I, Anexo II).

Grupo	n	D1	D2	D3	D4	D5	D6	
Média ± Erro padrão								P
GC	15	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	P>0,05
GT400	15	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	P>0,05
GT600	15	95,07 ^{ac} ± 3,24	98,36 ^b ± 1,20	92,44 ^a ± 4,23	95,84 ^{bc} ± 2,97	95,94 ^{bc} ± 2,97	97,91 ^{bc} ± 2,09	a≠b≠c: P<0,05
	P	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	

Tabela 14: *Ingestão voluntária (%) do total de alimento distribuído diariamente*

Tal como já foi referido no capítulo Materiais e Métodos, as dietas eram compostas, no caso do grupo controlo, por bagaço de soja, bagaço de girassol e cevada, e no caso do grupo GT400 por cevada e 0,4 kg de tremço. No grupo GT600, a relação tremço:cevada era mais elevada, ou seja, era fornecida ao animal uma maior quantidade de tremço para a mesma quantidade de cevada. Num estudo anterior (Jorge, 2009), o nível médio de ingestão dos animais alimentados exclusivamente com 0,4 kg desta espécie de tremço (*Lupinus albus*) foi de 73,5% da quantidade oferecida, significativamente inferior à ingestão dos grupos alimentados com tremço e cevada, provavelmente, conforme foi sugerido pela autora, como resultado do sabor amargo conferido pelos alcalóides existentes na semente utilizada em concentração superior à máxima recomendada (0,74% da MS vs 0,06% referida na bibliografia). Como forma de ultrapassar a redução na ingestão observada, e dada a ausência de patologias associadas aos alcalóides, Jorge (2009) sugeriu que se fizesse uma mistura do tremço com outro alimento mais apetecível ou que fosse feito um descasque e uma lavagem da semente de tremço. No presente trabalho, a mistura de cevada com o tremço, mesmo este tendo também um teor de alcalóides superior ao máximo recomendado (0,4% da MS), permitiu que os níveis de ingestão deste grupo fossem sempre superiores a 90% e apenas ligeiramente inferiores aos dos outros grupos ($P=0,054$, Tabela I, Anexo II).

De referir a inexistência de patologias associadas à ingestão de tremço. De facto, apesar de o tremço utilizado ter níveis de alcalóides superiores aos recomendados, pensamos, conforme sugerido por Filhó (2004), que seria necessária a ingestão de doses mais elevadas e num curto espaço de tempo para que se observassem quaisquer sintomas.

A ingestão do alimento é uma questão bastante importante, visto que se os animais não ingerirem todo o alimento, podem diminuir a sua performance reprodutiva, e também entrar em perda de condição corporal. O período de habituação ao tremço é também um aspecto muito importante, tanto para que não ocorram variações bruscas no tipo de alimentação dos animais, como para que a aceitação ao tremço no período de ensaio seja a melhor possível, não comprometendo os efeitos metabólicos e reprodutivos que se pretendem estudar.

2) Peso Vivo e Condição Corporal

O peso vivo e a condição corporal dos animais são factores muito importantes para a avaliação da adequação das quantidades de nutrientes fornecidos ao estado produtivo do animal, concretamente se cobrem as necessidades dos animais, se estão a ser excessivas, levando a um aumento de peso vivo e/ou da condição corporal, ou se estão a ser insuficientes, o que leva a perdas de peso vivo e/ou condição corporal dos animais.

No gráfico seguinte (Figura 8) verifica-se a evolução do peso vivo dos animais durante o ensaio.

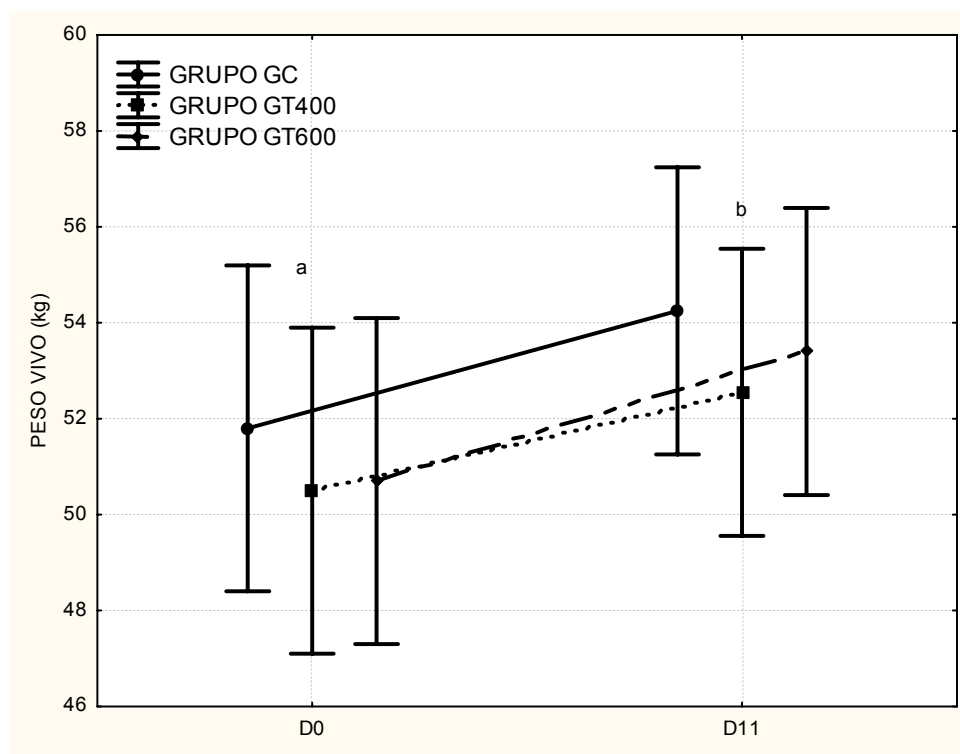


Figura 8: *Peso vivos (média ± EP) dos animais dos grupos GC, GT400 e GT600 antes (D0) e após o final do período de suplementação (D11). Efeito tempo: a ≠ b: P=0.000*

Não foi significativo o efeito do factor grupo ($P=0,787$), nem a interacção deste com o factor tempo ($P=0,443$). Contudo, o efeito do tempo foi significativo ($P=0,000$), verificando-se uma subida significativa do peso vivo de D0 para D11, em todos os grupos (Figura 8).

No gráfico seguinte observa-se a variação da condição corporal dos animais durante o período de ensaio.

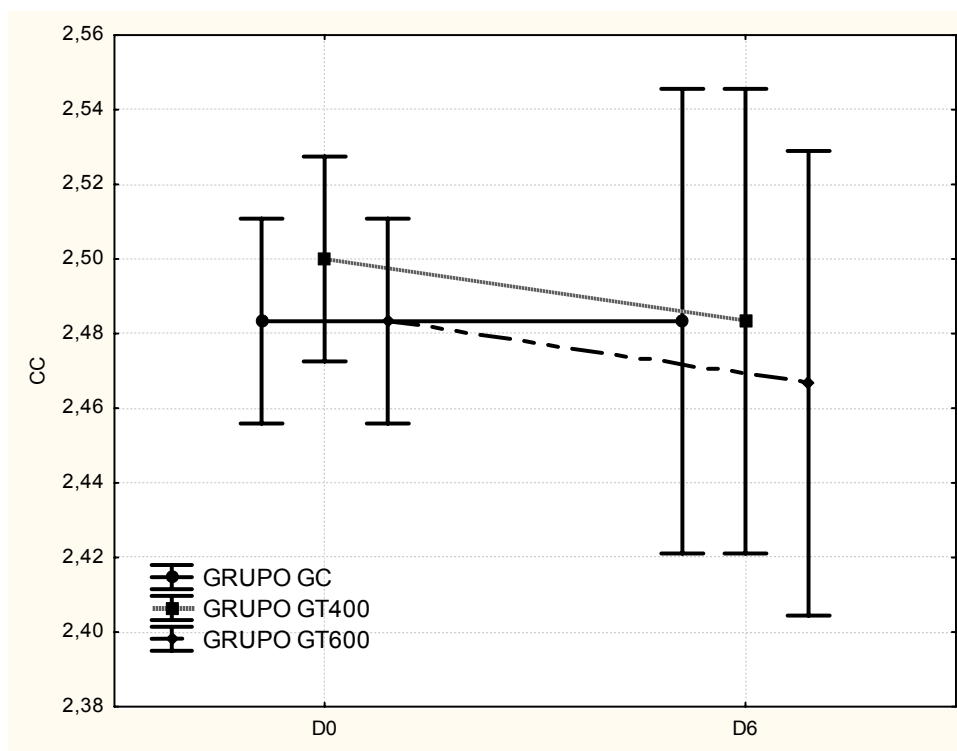


Figura 9: *Condição corporal (média ± EP) dos animais dos grupos GC, GT400 e GT600 antes (D0) e no final do período de suplementação (D6)*

Pela análise da condição corporal por ANOVA para medidas repetidas (Figura 9) verificou-se que esta variável não foi influenciada pelos factores grupo ($P=0,863$), tempo ($P=0,331$), nem pela sua interacção ($P=0,787$).

Conforme referimos no capítulo dos Materiais e Métodos, durante o período de ensaio houve um aumento da quantidade de PB e de EM da dieta de todos os grupos, sendo que as dietas dos grupos GC e GT600, com níveis proteicos e energéticos superiores aos fornecidos ao grupo GT400, eram isoproteicas e isoenergéticas. Analisando o PV e a

CC em conjunto, pode-se constatar que o aumento da PB e da EM durante o período de suplementação foi suficiente para aumentar o peso vivo nos três grupos em ensaio, mas não para aumentar a CC.

O uso de flushing antes da cobertura, em que se dá um aumento da qualidade e/ou da quantidade do alimento fornecido aos animais, é frequente e usualmente não se traduz em aumentos quer de PV quer de CC, dado o curto espaço de tempo em que é praticado. Com este tipo de suplementação pretende-se uma influência do tipo “efeito estático” na reprodução, em que ocorre um aumento da taxa de ovulação sem que ocorram alterações significativas quer no peso vivo, quer na condição corporal dos animais. Neste caso, verificou-se um aumento do PV.

3) Indicadores metabólicos

3.1) Ácidos Gordos Não Esterificados

Os AGNE resultam da mobilização de reservas corporais dos animais e o seu nível é tanto maior quanto maior for essa mobilização. Ou seja, se os animais estiverem em balanço energético negativo vão mobilizar as reservas corporais para colmatar as necessidades fisiológicas e vão, por isso, apresentar uma concentração maior de AGNE no sangue.

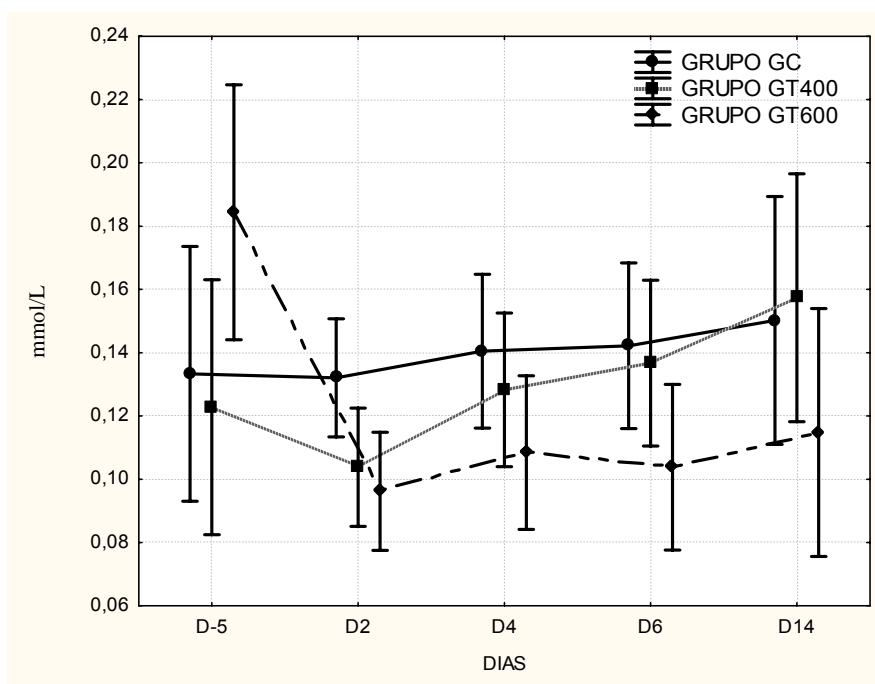


Figura 10: *Concentração sérica dos AGNE (média ± erro padrão) ao longo do tempo nos grupos GC, GT400e GT600*

A análise da concentração sérica de AGNE por ANOVA para medidas repetidas demonstrou não haver efeito significativo do grupo ($P=0,468$, Tabela II, Anexo II). O efeito tempo foi significativo ($P=0,005$, Tabela II, Anexo II), bem como a interação tempo X grupo ($P=0,001$, Tabela II, Anexo II), ou seja, apesar de não existirem diferenças entre os três grupos na concentração plasmática de AGNE ao longo do período de ensaio, são observadas diferenças entre a cinética de cada grupo ao longo do período de observação. A concentração de AGNE no grupo GC não variou ao longo do tempo, indicando não haver alterações na quantidade de reservas mobilizadas ao longo do período de ensaio. No grupo GT400, a concentração sérica de AGNE no D14 foi significativamente superior à dos dias D-5 e D2, indicando um maior nível de mobilização das reservas corporais naquele dia. No grupo GT600, a concentração sérica deste metabolito em D-5 era significativamente superior à observada nos restantes dias, sugerindo que em D-5 existiu uma mobilização das reservas corporais superior à observada nos restantes dias.

Grupo	n	D -5	D2	D4	D6	D 14	
Média ± Erro padrão							P
GC	10	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,01	$P>0,05$
GT400	10	0,12 ^a ± 0,01	0,10 ^a ± 0,01	0,13 ^{ab} ± 0,02	0,14 ^{ab} ± 0,02	0,16 ^b ± 0,03	$a \neq b$: $P<0,05$
GT600	10	0,18 ^a ± 0,03	0,09 ^b ± 0,01	0,11 ^b ± 0,01	0,10 ^b ± 0,01	0,11 ^b ± 0,01	$a \neq b$: $P<0,05$
	P	$P>0,05$	$P>0,05$	$P>0,05$	$P>0,05$	$P>0,05$	

Tabela 15: *Concentração sérica de AGNE (mmol/L)*

Os valores observados em todos os grupos indicam que os animais se encontravam claramente em balanço energético positivo, coerente com o aumento de peso vivo verificado. As variações detectadas ao longo do tempo têm pouco significado metabólico, denotando provavelmente fases de algum stress face às mudanças de dieta, o qual tem um efeito conhecido na concentração de AGNE. Embora não estatisticamente significativo ($P>0,05$), de salientar que no período de suplementação (D1 a D6), o nível mais baixo dos AGNE foi observado no grupo com maior inclusão de tremço (GT600), o que poderá

traduzir um maior equilíbrio de nutrientes e, logo, uma menor necessidade de mobilização de reservas.

3.2) Ureia

Nos animais, os principais factores que influenciam a concentração de ureia no sangue são a quantidade e degradabilidade da proteína da dieta, nomeadamente a quantidade de compostos azotados, bem como a quantidade de energia fornecida.

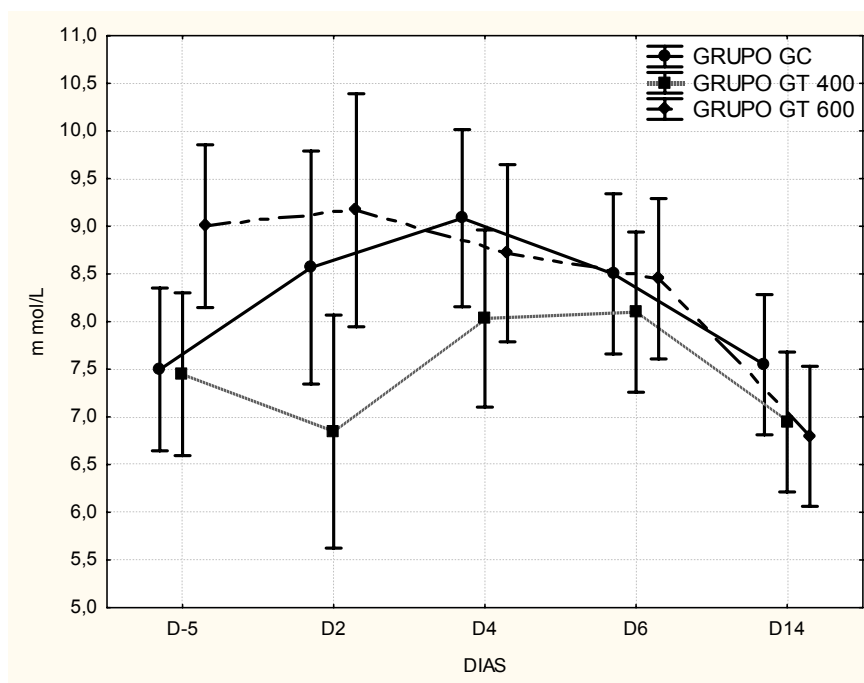


Figura 11: *Concentração sérica de ureia (média ± erro padrão) ao longo do tempo nos grupos GC, GT400e GT600*

O efeito do tempo foi significativo ($P=0,00015$, Tabela III, Anexo II), bem como a interação tempo x grupo ($P=0,029$, Tabela III, Anexo II). O efeito grupo apresentou um valor de P de 0,053. O grupo GT400 apresentou valores de ureia ligeiramente inferiores aos dos outros grupos, o que era esperado dado o menor teor proteico da sua dieta. Quanto aos grupos GC e GT600, apesar de receberem dietas isoproteicas e isoenergéticas, apresentam cinéticas diferentes deste metabolito ao longo do período de suplementação. No grupo GC a concentração de ureia atinge o seu valor máximo em D4, reduzindo-se até D14, a níveis iguais aos de D-5. No grupo GT600, o aumento do teor proteico da dieta fornecida entre D1 e D6 não induziu qualquer aumento da concentração de ureia neste período (Tabela 16), sugerindo que o tremço possui uma melhor relação entre o seu teor proteico e energético, ou mesmo uma proteína com menor degradabilidade ruminal.

Grupo	n	D -5	D2	D4	D6	D 14	
Média ± Erro padrão							P
GC	10	7,50 ^a ± 0,50	8,57 ^{ab} ± 0,68	9,08 ^b ± 0,30	8,50 ^{ab} ± 0,33	7,55 ^a ± 0,32	a≠b: P<0,05
GT400	10	7,45 ^{ab} ± 0,18	6,85 ^a ± 0,59	8,03 ^{bc} ± 0,37	8,10 ^b ± 0,33	6,95 ^{ac} ± 0,34	a≠b≠c: P<0,05
GT600	10	9,00 ^b ± 0,49	9,17 ^b ± 0,51	8,72 ^b ± 0,63	8,45 ^b ± 0,53	7,80 ^a ± 0,41	a≠b: P<0,05
	P	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	

Tabela 16: Concentração sérica de ureia (mmol/L)

Apesar destas diferenças, os valores de ureia encontrados situaram-se sempre no intervalo dos valores de referência para este metabolito (Kahn & Line, 2005, *cit* Caldeira *et al.*, 2007a), nomeadamente entre 3,7 e 9,3 mmol/L.

3.3) Glucose e insulina

A glucose é um bom indicador das carências ou excessos graves no fornecimento de alimentos. Mais especificamente, é um indicador do balanço energético em que o animal se encontra. O seu metabolismo é controlado pela insulina, que se revela um importante regulador da sua homeostasia, pelo que iremos fazer a sua análise conjuntamente (Figura 12). Esta hormona, como foi dito anteriormente, está correlacionada com a energia da dieta e sugere-se que seja o factor chave na regulação dos efeitos da ingestão de alimento na função ovárica (Armstrong *et al.*, 2001).

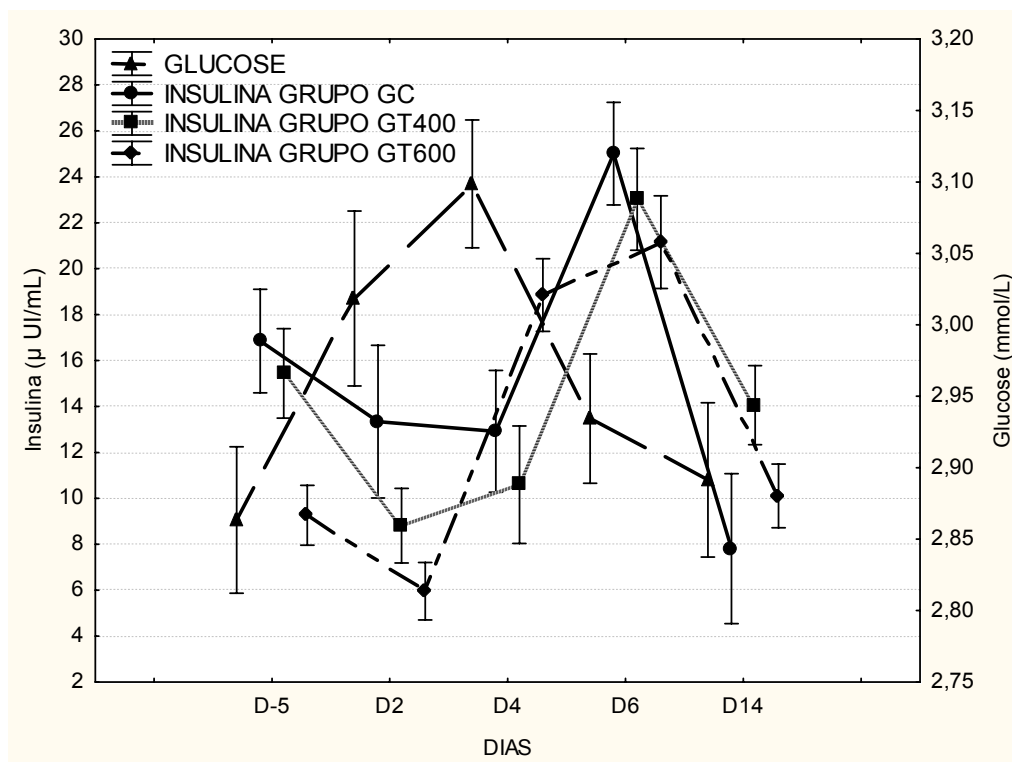


Figura 12: Concentração sérica de glucose (mmol/L; média \pm erro padrão) e plasmática de insulina (μ UI/mL; média \pm erro padrão) nos grupos GC, GT400e GT600 ao longo do tempo

Grupo	n	D -5	D2	D4	D6	D 14	
Média \pm erro padrão							P
GC	10	2,90 ^a \pm 0,08	3,03 ^{ab} \pm 0,14	3,16 ^b \pm 0,07	3,09 ^{ab} \pm 0,07	2,94 ^{ab} \pm 0,09	a#b P<0,05
GT400	10	2,88 ^a \pm 0,10	2,93 ^{ab} \pm 0,09	3,13 ^b \pm 0,08	2,88 ^a \pm 0,09	2,86 ^a \pm 0,09	a#b P<0,05
GT600	10	2,81 ^a \pm 0,10	3,10 ^b \pm 0,07	3,01 ^{ab} \pm 0,08	2,83 ^a \pm 0,05	2,87 ^a \pm 0,11	a#b P< 0,05
	P	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	

Tabela 17: Concentração sérica de glucose (mmol/L; média \pm erro padrão) nos grupos GC, GT400e GT600 ao longo do tempo

Grupo	n	D -5	D2	D4	D6	D 14	
Média ± erro padrão							P
GC	10	16,85 ^{A b} ± 2,26	13,34 ^{A ab} ± 3,33	12,92 ^{ab} ± 2,65	25,01 ^c ± 2,23	7,81 ^a ± 3,27	a≠b≠c: P<0,05
GT400	10	15,44 ^{A b} ± 1,95	8,81 ^{A a} ± 1,62	10,59 ^{ab} ± 2,56	23,02 ^c ± 2,21	14,06 ^{ab} ± 1,72	a≠b≠c: P<0,05
GT600	10	9,26 ^{B a} ± 1,30	5,96 ^{B a} ± 1,25	18,85 ^b ± 1,58	21,16 ^b ± 2,02	10,11 ^a ± 1,39	a≠b: P<0,05
	P	A≠B: P<0,05	A≠B: P<0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	

Tabela 18: Concentração plasmática de insulina (μUI/mL; média ± erro padrão) nos grupos GC, GT400e GT600 ao longo do tempo

A análise estatística realizada revelou que o tempo teve um efeito significativo ($P=0,002$, Tabela V, Anexo II) sobre a concentração de glucose, enquanto o factor grupo e a interacção deste com o tempo não foram significativos ($P=0,41$ e $P=0,52$, respectivamente; Tabelas V, Anexo II), pelo que na Figura 12 e na tabela 17 se apresenta a concentração média de glucose dos três grupos. Na concentração plasmática de insulina não houve qualquer efeito do grupo ($P=0,39$, Tabela IV, Anexo II), sendo contudo significativo o efeito do tempo e da interacção deste com o grupo ($P=0,00$ e $P=0,003$, respectivamente; Tabela IV, Anexo II) Observando a Figura 12 em conjunto com a tabela 17 e 18 verifica-se um aumento significativo da concentração de glucose em D2 e D4, reduzindo-se em D6, momento em que se observa uma subida significativa da concentração de insulina em todos os grupos. Estas variações sugerem que o aumento do aporte energético fornecido pelas dietas entre D1 e D6 levou ao aumento da concentração da glucose, o qual provocou uma resposta da insulina detectada em D6.

Pela análise da tabela 18 em conjunto com a figura 12 pode-se verificar que os grupos GC e GT400 têm valores mais elevados de insulina em D-5 e em D2, do que o grupo GT600, não existindo diferenças nos restantes dias, ou seja, verificou-se uma maior descida da concentração de insulina neste grupo numa primeira fase e, posteriormente, um maior aumento, para uma mesma concentração de glucose. Estes resultados, poderão ser indicadores de uma resposta diferente da secreção da insulina no caso das dietas com

tremoço, derivada provavelmente de uma produção mais lenta da glucose dado o tipo de hidratos de carbono presentes neste alimento.

3.4) Albumina

A análise de variância para medidas repetidas realizada evidenciou que os efeitos grupo e tempo não afectaram significativamente a concentração sérica de albumina ($P=0,79$ e $P=0,26$, respectivamente, Tabela VI, Anexo II), a qual foi contudo, afectada significativamente pela interacção entre aqueles factores ($P=0,0086$, Tabela VI, Anexo II). Esta interacção indica que os grupos apresentaram diferenças na cinética da albumina ao longo do tempo, observando-se nos grupos GC e GT400 um aumento significativo das concentrações deste metabolito no período de ensaio (Tabela 19).

Grupo	n	D -5	D2	D4	D6	D 14	
Média \pm erro padrão							P
GC	10	39,27 ^{ac} \pm 0,52	38,70 ^a \pm 1,22	40,42 ^{bc} \pm 0,58	40,78 ^b \pm 0,60	40,90 ^b \pm 0,57	$a \neq b \neq c$: $P < 0,05$
GT400	10	39,67 ^a \pm 0,48	40,19 ^{ab} \pm 0,46	40,83 ^{ab} \pm 0,47	41,36 ^b \pm 0,58	40,49 ^{ab} \pm 0,48	$a \neq b$: $P < 0,05$
GT600	10	40,78 \pm 0,81	40,88 \pm 0,77	40,28 \pm 0,64	39,50 \pm 0,64	40,09 \pm 0,87	$P > 0,05$
	P	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$	

Tabela 19: Concentração sérica de albumina (g/L)

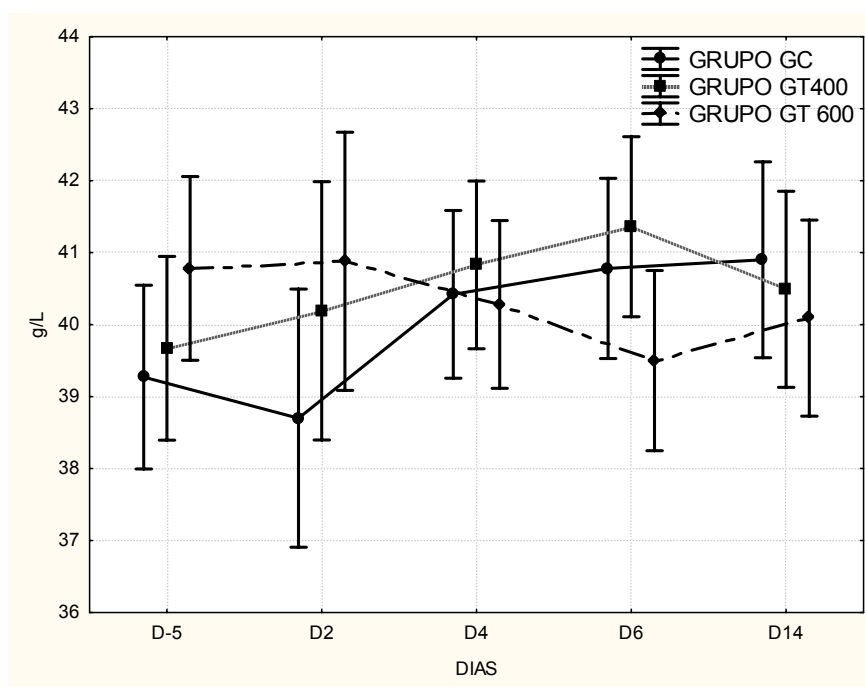


Figura 13: *Concentração sérica de albumina (g/L; média ± erro padrão) ao longo do tempo nos grupos GC, GT400e GT600*

A albumina, além de constituir uma reserva de proteína que o animal mobiliza em caso de necessidade, é um excelente indicador de alterações a médio e longo prazo do fornecimento proteico (Caldeira, 2005, 2007). Não eram portanto expectáveis alterações na sua concentração num tão curto espaço de tempo. De realçar os valores elevados observados em todos os grupos, denotando a abundância dos seus precursores e a provável síntese máxima desta proteína.

De salientar também, mais uma vez, o grupo GT600 o qual, apesar do aumento da PB fornecida durante o período de suplementação, não apresentou um aumento da concentração de albumina, ao contrário do observado especialmente no grupo GC, sugerindo de novo diferenças na proteína fornecida pelo tremço.

4) **Indicadores reprodutivos**

Em todos os animais ocorreu o estro e não se verificaram variações significativas entre grupos no que respeita ao intervalo entre a remoção das esponjas e o estro. Isto mostra que a utilização de esponjas vaginais é um método eficaz na sincronização deaios. Por outro lado, o facto de não se terem verificado diferenças entre grupos leva a supor que o tremço não induziu alterações endócrinas significativas no mecanismo fisiológico que culmina no cio.

Grupo	Intervalo entre a remoção das esponjas e o estro (média ± EP)
GC	41,60 h ± 2,75
GT400	45,40 h ± 3,51
GT600	42,27 h ± 2,50
	<i>P>0,05</i>

Tabela 20: *Intervalo entre a remoção de esponjas e o estro nos grupos GC, GT400 e GT600*

No que diz respeito às taxas de fertilidade, de prolificidade e de partos duplos não foram observadas diferenças entre os grupos em ensaio, nem no que diz respeito ao peso médio dos borregos nascidos (Tabela 20).

	n	Taxa de fertilidade	Taxa de partos duplos	Taxa de prolificidade	Peso dos borregos
GC	10	70,00 % (7/10)	57,14 % (4/7)	1,57 (11/7)	4,18 ± 0,21
GT400	10	100,00 % (10/10)	50,00 % (5/10)	1,50 (15/10)	3,62 ± 0,23
GT600	10	70,00 % (7/10)	42,90 % (3/7)	1,43 (10/7)	4,01 ± 0,22
	<i>P</i>	<i>P</i> >0,05	<i>P</i> >0,05	<i>P</i> >0,05	<i>P</i> >0,05

Tabela 21: *Taxas de fertilidade, prolificidade e de partos duplos e peso médio dos borregos nascidos nos grupos GC, GT400 e GT600*

Após a suplementação com tremço no fim da fase lútea do ciclo éstrico são referidos aumentos da taxa de ovulação em cerca de 20 a 30%, comparativamente à obtida em animais não suplementados (Downing *et al.*, 1995; Nottle *et al.*, 1997a; Kosior-Korzecka e Bobowiec, 2003; Viñoles, 2003; Somchit *et al.*, 2007), sem que sejam observadas alterações do PV ou da CC dos animais.

Neste nosso trabalho, não podemos deixar de notar que os valores da taxa de partos duplos e consequente prolificidade observados são superiores à média da raça, denotando um bom estado nutricional e sugerindo que todo o potencial genético determinante destes parâmetros já se encontra expresso, quer nos animais dos grupos suplementados com tremço, quer nos animais do grupo controle, o que poderá justificar a ausência de diferenças significativas entre grupos.

Assim, provavelmente os aumentos da taxa de ovulação referidos pelos outros autores, após a suplementação com tremço, resultam do aumento de aporte energético e/ou proteico, e não de nenhum componente específico da semente do tremço. Estes nossos resultados vêm corroborar esta hipótese, uma vez que neste nosso trabalho houve uma suplementação energética e proteica dos três grupos experimentais, utilizando quer o tremço quer outras matérias-primas, que se traduziu pela inexistência de diferenças quer nas taxas de fertilidade quer de prolificidade.

V. CONCLUSÕES

A suplementação com diferentes níveis de tremço (0,4 e 0,6 kg) no período de pré-cobrição de ovelhas Merino Branco apresentou os seguintes efeitos:

1) Ingestão de alimento

Os animais do grupo controlo (GC) e do grupo GT400 ingeriram a totalidade do alimento disponibilizado diariamente, enquanto que as ingestões dos animais do grupo GT600 foram mais variáveis e ligeiramente inferiores, apesar de sempre superiores a 90% ($P=0,054$). A mistura do tremço com cevada parece ter diluído o sabor amargo daquela semente conferido pelos alcalóides, tornando-a mais palatável para os animais.

Analisando o peso vivo e a condição corporal em conjunto, pode-se constatar que o aumento da proteína bruta e da energia metabolizável durante o período de suplementação foi suficiente para aumentar o peso vivo nos três grupos em ensaio, mas não para aumentar a condição corporal, visto ser uma suplementação de curto prazo.

2) Estado nutricional

O estado nutricional dos animais, avaliado através dos parâmetros AGNE, ureia, albumina, glucose e insulina, permitiu concluir que todos os animais se encontravam nutricionalmente equilibrados, visto que todos os valores se encontravam dentro dos parâmetros recomendados para esta espécie.

A concentração sérica de ureia reflecte os diferentes níveis de proteína fornecida, tendo o grupo GT400 uma menor concentração deste metabolito. A subida de concentração de ureia durante o período de suplementação no grupo GC, e a ausência de subida no grupo GT600, sugere que o tremço poderá ter uma proteína com menor degradabilidade ou uma melhor relação proteína/energia.

A análise conjunta da glucose e insulina, particularmente quando são comparados os grupos GC e GT600, sugere um potencial insulínico do tremço, evidenciada uma resposta diferente da secreção da insulina no caso das dietas com tremço, derivada provavelmente de uma produção mais lenta da glucose, dado o tipo de hidratos de carbono presentes neste alimento.

3) Indicadores reprodutivos

A ausência de diferenças nos indicadores reprodutivos nos grupos recebendo tremoço comparativamente ao grupo controle sugere que a maior taxa de ovulação obtida por outros autores após a suplementação com tremoço se deve ao aumento do fornecimento energético e/ou proteico e não a qualquer componente específico daquela semente.

BIBLIOGRAFIA

- ABECIA, JOSÉ-AFONSO; SOSA, C.; FORCADA, F.; MEIKLE, A.; (2006); The effect of undernutrition on the establishment of pregnancy in the ewe; *Reproduction Nutrition and Development*; **vol. 46**; pp. 367-378.
- ABREU, J. M.; BRUNO-SOARES, A. M.; CALOURO, F.; (2000); Intake and nutritive value of mediterranean forrages and diets – 20 years of experimental data; Instituto Superior de Agronomia – UTL; Laboratório Químico Agrícola Rebelo da Silva – INIA.
- ARMSTRONG, D. G.; GONG, J. G.; GARDNER, J. O.; BAXTER, G.; HOGG, C. O.; WEBB, R.; (2001); Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short term changes in dietary intake; *Reproduction*; **vol. 123**; pp. 371 – 378.
- ASHWORTH C. J.; SALES, D. I.; WILMUT, I.; (1989); evidence of an association between the survival of embryos and the periovulatory plasma progesterone concentration in the ewe; *Journal of Reproduction and Fertility*; **vol. 87**; pp. 23 – 32.
- BARNEVELD, R. J. V.; (1999); Understanding the nutritional chemistry of lupin (*Lupinus* ssp.) seed to improve livestock production efficiency; *Nutrition Research Reviews*; **vol. 12**; pp. 203-230.
- BARTLEWSKI, P. M.; BEARD, A. P.; COOK, S. J.; RAWLINGS, N. C.; (1998); ovarian follicular dynamics during anoestrous in ewes; *Journal of Reproduction and Fertility*; **vol. 113**; pp. 275 – 285.
- BARTLEWSKI, P. M.; VANDERPOL, J.; BEARD, A. P.; COOK, S. J.; RAWLINGS, N. C.; (2000); Ovarian antral follicular dynamics and their associations with peripheral concentrations of gonadotropins and ovarian steroids in anoestrous Finnish Landrace ewes; *Animal Reproduction Science*; **vol. 58**; pp. 273-291.
- BARTLEWSKI, P. M.; BEARD, A. P.; COOK, S. J.; CHANDOLIA, R. K.; HONARAMOOZ, A.; RAWLINGS, N. C.; (1999a); Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy; *Journal of Reproduction and Fertility*; **vol. 115**; pp. 111-124.
- BARTLEWSKI, P. M.; BEARD, A. P.; RAWLINGS, N. C.; (1999b); An ultrasonographic study of luteal function in breeds of sheep with different ovulation rates; *Theriogenology*; **vol. 52**; pp. 115-130.

- BLANCHE, D.; TELLAM, R. L.; CHAGAS, L. M.; BLACKBERRY, M. A.; VERCOE, P. E.; MARTIN, G. B.; (2000); Level of nutrition affects leptin concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in sheep; *Journal of endocrinology*; vol. **165**; pp. 625-6.
- BOLAND, M. P.; LONERGAN, P.; O'CALLAGHAN; (2001); Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology and oocyte and embryo development; *Theriogenology*; vol. **55**; pp. 1323-1340.
- BOUKHLIQ, R., ADAMS, N.R., MARTIN, G.B., (1996) Effect of nutrition on the balance of production of ovarian and pituitary hormones in ewes. *Animal Reproduction Science*; vol. **45**; pp. 59–70.
- BRAND, T. S.; FRANCK F.; DURAND, A.; COETZEE, J.; (1997); Intake and production of ewes grazing oat stubble supplemented with sweet lupin (*Lupinus albus*) seed; *Small Ruminant Research*; vol. **26**; pp. 93-103.
- CAHILL, L. P.; MARIANA, J. C.; MAULÉON, P.; (1979); Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates; *Journal of reproduction and fertility*; vol. **55**; pp. 27 – 36.
- CALDEIRA, R. M. V. H; (1988); Contribuição ao estudo da interpretação metabólica e fisiológica das variações da condição corporal na fêmea ovina; Tese para obtenção do grau de Mestre; Universidade Técnica de Lisboa – Escola Superior de Medicina Veterinária; Lisboa.
- CALDEIRA, R. M. V. H; (1995); Contributo para a interpretação metabólica da condição corporal e da sua variação na fêmea ovina; Tese de Doutoramento; Universidade Técnica de Lisboa – Faculdade de Medicina Veterinária; Lisboa.
- CALDEIRA, R. M.; VAZ PORTUGAL, A.; (1998); Condição corporal: conceitos, métodos de avaliação e interesse na sua utilização como indicador na exploração de ovinos; *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*; vol. **43**; pp. 95 – 103.
- CALDEIRA, R. M.; ALMEIDA, M. A.; SANTOS, C. C.; VASQUES, M. I.; VAZ PORTUGAL, A.; (1999); Daily variation in blood enzymes and metabolites in ewes under three levels of feed intake; *Canadian Journal of Animal Science*; vol. **79**; pp. 157 – 164.
- CALDEIRA, R. M; (2005); Monitorização da adequação do plano alimentar e do estado nutricional em ovelhas; *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*; vol. **100**; pp. 125-139.

- CALDEIRA, R. M.; BELO, A. T.; SANTOS, C. C.; VAZQUES, M. I.; PORTUGAL, A. V.; (2007a); The effect of long-term feed restriction and over nutrition on body condition score, blood metabolites and hormonal profiles in ewes; *Small Ruminant Research*; **vol. 68**; pp. 242 – 255.
- CALDEIRA, R. M.; BELO, A. T.; SANTOS, C. C.; VAZQUES, M. I.; PORTUGAL, A. V.; (2007b); The effect of body condition score on blood metabolites and hormonal profiles in ewes; *Small Ruminant Research*; **vol. 68**; pp. 233 – 241.
- CAMPBELL, B. K.; SCARAMUZZI, R. J.; WEBB, R.; 1995; Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*; **vol. 49**; pp. 335.
- CAMPOS, L. S.; (1998); Entender a Bioquímica – o metabolismo fundamental em animais e plantas; Lisboa; Escolar Editora; pp. 410.
- CANNAS, A.; PES, A.; MANCUSO, R.; VODRET, B.; NUDDA, A.; (1998); Effect of dietary energy and protein concentration on the concentration of milk urea nitrogen in dairy ewes; *Journal of Dairy Science*; **vol. 81**; pp. 499 – 508.
- CLARKE, I. J.; HENRY, B. A.; (1999); Leptin and reproduction; *Reviews of reproduction*; **vol. 4**; pp. 48-55.
- DANIEL, J. A.; WHITLOCK, B. K.; BAKER, J. A.; STEELE, B.; MORRISON, C. D.; KEISLER, D. H.; SARTIN, J. L.; (2002); Effect of body fat mass and nutritional status on 24-hour leptin profiles in ewes; *Journal of Animal Science*; **vol. 80**; pp. 1083 – 1089.
- DOWNING, J. A.; JOSS, J.; CONNELL, P.; SCARAMUZZI, R. J.; (1995); Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophic and metabolic hormones in ewes fed lupin grain; *Journal of Reproduction and Fertility*; **vol. 103**; pp. 137-145.
- DOWNING, J. A.; SCARAMUZZI, R. J.; (1997); The effect of the infusion of insulin during the luteal phase of the estrous cycle on the ovulation rate and on plasma concentrations of LH, FSH, and glucose in ewes; *Theriogenology*; **vol. 47**; pp. 747 – 759.
- DRIANCOURT, M. A.; WEBB, R.; FRY, R.C.; (1991); Does follicular dominance occur in ewes?; *Journal of Reproduction and Fertility*; **vol. 93**; pp. 63-70.
- DRIANCOURT, M. A.; (2001); Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction; *Theriogenology*; **vol. 55**; pp. 1211 – 1239.

- DUGGAVATHI, R.; BARTLEWSKI, P. M.; BARRETT, D. M. W.; RAWLINGS, N. C.; (2003); Use of high-resolution transrectal ultrasonography to assess changes in numbers of small ovarian antral follicles and their relationships to the emergence of follicular waves in cyclic ewes; *Theriogenology*; vol. **60**; pp. 495-510.
- DUGGAVATHI, R.; BARTLEWSKI, P. M.; BARRET, D. M. W.; GRATTON, C.; BAGU, E. T.; RAWLINGS, N. C.; (2004); Patterns of antral follicular wave dynamics and accompanying endocrine changes in cyclic and seasonally anestrous ewes treated with endogenous ovine follicle stimulating hormone during the inter-wave interval; *Biology of Reproduction*; vol. **70**; pp. 821-827.
- DUGGAVATHI, R.; BARTLEWSKI, P. M.; AGG, E.; FLINT, S.; BARRET, D. M. W.; RAWLINGS, N. C.; (2005); The effect of the manipulation of follicle-stimulating hormone (FSH)-peak characteristics on follicular wave dynamics in sheep: Does an ovarian-independent endogenous rhythm in FSH secretion exist?; *Biology of reproduction*; vol. **72**; pp.1466-1474.
- EVANS, A. C. O.; DUFFY, P.; HUNES, N.; BOLAND, M. P.; (2000); Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep; *Theriogenology*; vol. **53**; pp. 699-715.
- FILHÓ, C. C. T.; (2004); Influência da maceração e da moenda nas quantidades ingeridas de tremocilha amarga (*Lupinus luteos L.*) por ovinos; Relatório do trabalho de fim de curso de Engenharia Agrónoma; UTL – Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- FINDLAY, J. K.; CUMMING, I. A.; (1976); FSH in the ewe: effects of season, live weight and plane of nutrition on plasma FSH and ovulation rate; *Biology of reproduction*; vol. **15**; pp. 335 – 342.
- FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; EVANS, A. C. O.; TURZILLO, A. M.; (2001); Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle; *Biology of Reproduction*; vol. **65**; pp. 648-654.
- Fortune, J.E.; (2003); The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles; *Animal Reproduction Science*; vol. **78**; pp. 135-163.
- FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y.; (2004); Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle; *Animal Reproduction Science*; vol. **82-83**; pp. 109-126.

- FUENTES, O. V.; FUENTES, P. I.; (2006); The effect of body weight changes during the breeding season on the ovulation rate, blood progesterone levels and embryo survival of the crossbred Mexican ewe; *Journal of Animal and Veterinary Advances*; vol. **(5) 9**; pp. 741-743.
- GIBBONS, J.R., KOT, K., THOMAS, D.L., WILTBANK, M.C. E GINTHER, O.J.; (1999); Follicular and FSH dynamics in ewes with a history of high and low ovulation rates; *Theriogenology*; vol. **52**: pp. 1005-1020.
- GINTHER, O. J.; KOT, K.; WILTBANK, M. C.; (1995); Associations between emergence of follicular waves and fluctuations during the estrous cycle in ewes; *Theriogenology*; vol. **43**; pp. 689 – 703.
- HARESIGN, W.; (1981); The influence of nutrition on reproduction in the ewe – 1 – Effects on ovulation rate, follicle development and luteinizing hormone release; *Animal Production*; vol. **32**; pp. 197 – 202.
- HENDERSON, D. C.; (1990); *The veterinary book for sheep farmers*; UK; Farming press; pp. 79-110.
- HOFFMAN, P. C.; ESSER, N. M.; BAUMAN, L. M.; DENZINE, S. L.; ENGSTROM, M.; CHESTER-JONES, H.; (2001); Effect of dietary protein on growth and nitrogen balance of Holstein heifers; *Journal of Dairy Science*; vol. **84**; pp. 843 – 847.
- HUNTER, M. G.; ROBINSON, R. S.; MANN, G. E.; WEBB, R.; (2004); Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species; *Animal Reproduction Science*; vol. **82-83**; pp. 461-477.
- JARRIGE, R.; (1988); *Alimentação de Bovinos, Ovinos e Caprinos*; Paris; Publicações Europa-América.
- JOHNSON, D.E.; FERRELL, C.L.; JENKINS, T.G.; (2003); The history of energetic efficiency research: Where have we been and where are we going? *Journal of Animal Science*; vol. **81**; pp. E27 - E38.
- JORGE, SARA ALEXANDRA PINTO; (2009); Efeito da suplementação com *Lupinus albus* no período pré-cobrição sobre o estado nutricional e a taxa de concepção de ovelhas Merino Branco em condição corporal estável ou crescente; Tese para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Zootécnica – Produção Animal, FMV, ISA, UTL.

- KIYMA, Z.; ALEXANDER, B. M.; VAN KIRK, E. A.; MURDOCH, W. J.; HALLFORD, D. M.; MOSS, G. E.; (2004); Effects of feed restriction on reproductive and metabolic hormones in ewes; *Journal of Animal Science*; vol. **82**; pp. 2548-2557.
- KNIGHT, P. G.; CLAIRE, G.; (2006); Focus on TGF- β signaling – TGF- β superfamily members and ovarian follicle development; *Reproduction*; vol. **132**; pp. 191-206.
- KOSIOR-KORZECKA, U, BOBOWIEC, R; (2003); Changes in the level of endogenous leptin, FSH, 17 β -oestradiol and metabolites during lupin-induced increase in ovulation rate in ewes; *Journal Veterinary Medicine, series A*; vol. **50**; pp. 343.
- KURLOVICH, B. S.; KARTUZOVA, L. T.; HEINÄNEN, J.; BENKEN, I. I.; CHMELEVA, Z. V.; BERNATSKAYA, M. L.; (2002a); Biochemical Composition; IN: Lupins – Geography, classification, genetic resources and breeding; Edited by Kurlovich, B. S.; St. Petersburg; Publishing House.
- KURLOVICH, B. S. STANKEVICH, A. K.; STEPANOVA, S. I.; (2002b); The review of the genus *Lupinus* L.; IN: Lupins – Geography, classification, genetic resources and breeding; Edited by Kurlovich, B. S.; St. Petersburg; Publishing House.
- LEURY, B. J.; MURRAY, P. J.; ROWE, J. B.; (1990); Effect of nutrition on the response in ovulation rate in merino ewes following short-term Lupin supplementation and insulin administration; *Australian Journal of Agricultural Research*; vol. **41**; pp. 751 – 759.
- LINDSAY, D. R.; MARTIN, G. B.; WILLIAMS, I. H; (1993); Nutrition and reproduction; IN: World animal science – B - Disciplinary Approach – 9 – Reproduction In Domesticated Animals; Elsevier.
- LOPEZ-ORTIZ, S.; PANTER, K. E.; PFISTER, J. A.; LAUNCHBAUGH, K. L.; (2004); The effect of body condition on disposition of alkaloids from silvery lupine (*Lupinus argenteus* Pursh) in sheep; *Journal of Animal Science*; vol. **82**; pp. 2798-2805.
- LUCAS, M. R. V.; COELHO, M. L.; CALÇÃO, S.;(2001); Caracterização Técnico-económica da produção de ovinos da raça campaiça e merina branca e de bovinos das raças Alentejana e Mertolenga; *Revista Portuguesa de Zootecnia*; vol. VIII, 2; pp. 23 – 31.
- MCDONALD, P.; EDWARDS, R. A.; GREENHALGH J.F.D.; MORGAN, C.A.; (2002) *Animal Nutrition* Sixth Edition; England; Pearson Prentice Hall.
- MCNATTY, K. P.; HUDSON, N.; GIBB, M.; BALL, K.; HENDERSON K. M.; HEATH, D. A.; LUN, S.; KIEBOOM, L. E.; (1985); FSH influences follicle viability, oestradiol

- biosynthesis and ovulation rate in Romney ewes; *Journal of reproduction and fertility*; **vol. 75**; pp. 121 – 131.
- MOLLE, G.; BRANCA, A.; LIGIOS, S.; SITZIA, M.; CASU, S.; LANDAU, S.; ZOREF, Z.; (1995); Effect of grazing background and flushing supplementation on reproductive performance in Sarda ewes; *Small Ruminant Research*; vol. **17**; pp. 245-254.
- MORI, R. M.; RIBEIRO, E. L. A.; MIZUBUTI, I. Y.; ROCHA, M. A.; SILVA, L. D. F.; (2006); Desempenho reprodutivo de ovelhas submetidas a diferentes formas de suplementação alimentar antes e durante a estação de monta; *Revista Brasileira de Zootécnica*; vol. **35** (suplemento); pp. 1122-1128.
- MUÑOZ-GUTIÉRREZ, M.; BLANCHE, D.; MARTIN, G. B.; SCARAMUZZI, R. J.; (2002); Folliculogenesis and ovarian expression of mRNA encoding aromatase in anoestrous sheep after 5 days of glucose or glucosamine infusion or supplementary lupin feeding; *Reproduction*; vol. **124**; pp. 721-731.
- MUÑOZ-GUTIÉRREZ, M.; BLANCHE, D.; MARTIN, G. B.; SCARAMUZZI, R. J.; (2004); Ovarian follicular expression of mRNA encoding type 1 IGF receptor and IGF-binding protein-2 in sheep following five days of nutritional supplementation with glucose, glucosamine or lupins; *Reproduction*; vol. **128**; pp. 747-756.
- NAGATANI, S.; ZENG, Y.; KEISLER, D. H.; FOSTER, D. L.; JAFFE C. A.; (2000); Leptin regulates pulsatile luteinizing hormone and growth hormone secretion in the sheep; *Endocrinology*; vol. **141**; pp. 3965-3975.
- NOEL, B.; BISTER, J. L.; PAQUAY, R.; (1993); Ovarian follicular dynamics in Suffolk ewes at different periods of the year; *of Reproduction and Fertility*; **vol. 99**; pp. 695 – 700.
- NOTTLE, M. B.; HYND, P. I.; SEAMARK, R. F.; SETCHELL B. P.; (1988); Increases in ovulation rate in lupin-fed ewes are initiated by increases in protein digested post-ruminally; *Journal of Reproduction and Fertility*; **vol. 84**; pp. 563-566.
- NOTTLE, M. B.; KLEEMANN, D. O.; GROSSER, T. I.; SEAMARK, R. F.; (1997a); Evaluation of a nutritional strategy to increase ovulation rate in Merino ewes mated in late spring-early summer; *Animal Reproduction Science*; **vol. 47**; pp. 255-261.
- NOTTLE, M. B.; KLEEMANN, D. O.; SEAMARK, R. F.; (1997b); Effect of previous undernutrition on the ovulation rate of Merino ewes supplemented with lupin grain; *Animal Reproduction Science*; vol. 49; pp. 29-36.

- NOTTLE, M.B.; KLEEMAN, D.O.; HOCKING, V.M.; GROSSER, T.I.; SEAMARK, R.F.; (1998); Development of a nutritional strategy for increasing lamb survival in Merino ewes mated in late spring-early summer. *Animal Reproduction Science*, **vol. 52**: 213-219.
- O'CALLAGHAN, D.; YAAKUB, H.; HYTTEL, P.; SPICER, L. J.; BOLAND, M. P.; (2000); Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes; *Journal of reproduction and Fertility*; vol. **118**; pp. 303-313.
- OCAK, N.; CAM, M. A.; KURAN, M.; (2006); The influence of pré- and post-mating protein supplementation on reproductive performance in ewes maintained on rangeland; *Small Ruminant Research*; vol. **64**; pp. 16-21.
- OLIVEIRA, J. P. C.; (2001); Estimativa do peso adulto num efectivo de Raça Merino Branco; Relatório do trabalho final de curso de Engenharia agrónomica; Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa.
- PEARSE, B. H. G.; MCMENIMAN, N. P.; GARDNER, I. A.; (1994); Influence of body condition on ovulatory response to lupin (*Lupinus angustifolius*) supplementation of sheep; *Small Ruminant Research*; vol. **13**; pp. 27-32.
- PENHA, B. R.; (2002); Efeito da suplementação lipídica e do tipo de dieta no crescimento e qualidade das carcaças de borregos Merino Branco; Relatório do trabalho final de curso de Engenharia Agrónomica; Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa.
- RAMALHO, R. C. V.; (2008); Efeito de Taninos condensados na degradabilidade ruminal da fracção proteica de grão de tremçoço (*Lupinus albus*); Relatório de trabalho de final de curso de Engenharia Zootécnica; UTL – Instituto Superior de Agronomia; Lisboa.
- RAVINDRA, J. P.; RAWLINGS, N. C.; EVANS, A. C. O.; ADAMS, G. P.; (1994); Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the oestrous cycle; *Journal of reproduction and fertility*; vol. **101**; pp. 501 – 509.
- RAWLINGS, N. C.; EVANS, A. C. O.; HONARAMOOZ, A.; BARTLEWSKY, P. M.; (2003); Antral follicle growth and endocrine changes in pubertal cattle, sheep and goats; *Animal Reproduction Science*; **vol. 78**; pp. 259-270.
- RHIND, S. M.; MCKELVEY, A. C.; MCMILLEN, S.; GUNN, R. G.; ELSTON, D. A.; (1989a); Effect of restricted food intake, before and/or after mating, on the reproductive performance of greyface ewes; *Animal Production*; **vol. 48**; pp. 149-155.

- RHIND, S. M.; (1992); Nutrition: its effects on reproductive performance and its hormonal control in female sheep and goats; IN: Speedy A. W.; Progresses in sheep and goat research; CAB International; UK; pp. 25-47.
- RIVERA, G. M.; FORTUNE, J. E.; (2001); Development of codominant follicles in cattle is associated with a follicle-stimulating hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein-4 protease; *Biology of reproduction*; vol. **65**; pp. 112-118.
- ROBINSON, J. J.; ASHWORTH, C. J.; ROOKE, J.A.; MITCHELL, L.M.; MCEVOY, T.G.; (2006); Nutrition and fertility in ruminant livestock; *Animal feed science and technology*; vol. **126**; pp. 259-276.
- ROSA, H. J. D.; BRYANT, M. J.; (2003); Seasonality of reproduction in sheep; *Small Ruminant Research*; vol. **48**; pp. 157 – 171.
- SCARAMUZZI, R. J.; RADFORD, H. M. (1983); Factors regulating ovulation rate; *Journal of Reprouction Fertility.*; vol. **69**; pp. 353-367.
- SCARAMUZZI, R. J.; ADAMS, N. R.; BAIRD, D. T.; CAMPBELL, B. K.; DOWNING, J. A.; FINDLAY, J. K.; HENDERSON, K. M.; MARTIN, G. B.; MCNATTY, K. P.; MCNEILLY, A. S.; TSONIS, C. G.; (1993); A model of follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe; *Reproduction, Fertility and Development*; vol. **5**; pp. 459 – 78.
- SCARAMUZZI, R. J.; CAMPBELL, B. K.; DOWNING, J.A.; KENDAL, N. R.; KHALID, M.; MUÑOZ-GUTIÉRREZ, M.; SOMCHIT, A.; (2006); A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate; *Reproduction Nutrition and Development*; vol. **46**; pp. 339-354.
- SCARAMUZZI, R.J. AND MARTIN, G.B; (2008); The importance of interactions among nutrition, seasonality and socio-sexual factors in the development of hormone free methods for controlling fertility; *Reproduction in Domestic Animals*, vol. **43**, Suppl 2, pp. 129 - 136.
- SIMÕES, J. A.; MENDES, A.; SENDIM, A.; QUINTELA, R.; (2003); influência do regime alimentar e do sexo na composição de carcaças de borregos da raça Merino branco a um mesmo peso de carcaça; *Revista Portuguesa de Zootécnia*; vol. **1**; pp. 89 – 97.
- SOMCHIT, A.; CAMPBELL, B. K.; KHALID, M.; KENDALL, N. R.; SCARAMUZZI, R. J.; (2007); The effect of short-term nutritional supplementation of ewes with lupin grain (*Lupinus luteus*) during the luteal phase of the estrous cycle on the number of ovarian

- follicles and the concentrations of hormones and glucose in plasma and follicular fluid; *Theriogenology*; vol. **68**; pp. 1037-1046.
- SOUZA, C. J. H.; CAMPBELL, B. K.; BAIRD, D. T.; (1998); Follicular waves and concentrations of steroids and inhibin A in ovarian venous blood during the luteal phase of the oestrous cycle in ewes with an ovarian autotransplant; *Journal of Endocrinology*; vol. 156, pp. 563–572.
- STEWART, R; OLDHAM, CM.; (1986); Feeding lupins to ewes for four days during the luteal phase can increase ovulation rate; *Animal Production in Australia*; vol. **16**; pp. 367-369.
- SZYMANSKI, L. A.; SCHNEIDER, J. E.; FRIEDMAN, M. I.; JI, H.; KUROSE, Y.; BLANCHE, D.; RAO, A.; DUNSHEA, F. R.; CLARKE, I. J.; (2007); Changes in Insulin, Glucose and Ketone Bodies, But Not Leptin or Body Fat Content Precede Restoration of Luteinising Hormone Secretion in Ewes; *Journal of Neuroendocrinology*; vol. **19**; pp. 449-460.
- THOMPSON, J. AND MEYER, H. (1994); Body condition scoring of sheep; *Oregon State University Extension Service*; April, EC 1433.
- VAN WEZEL AND RODGERS. R.J.; (1996); Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment *in vivo*; *Biology of Reproduction*; Vol. **55**; pp. 1003–1011.
- VASQUES, M. I.; CAVACO-GONÇALVES, S.; MARQUES, C. C.; BARBAS, J. P.; BAPTISTA, M. C.; CUNHA, T. P.; HORTA, A. E. M.; (2006); The effect of ram exposure previous to progestagen oestrus synchronization on corpus luteum function and fertility in crossbred ewes IN Animal products from the Mediterranean area; EAAP publication No. 119; Ed: JMC Ramalho Ribeiro, AEM Horta, C Mosconi and A Rosati; Wageningen Academic Publishers – Netherlands, pp. 343 – 348.
- VIÑOLES, C.; FORSBERG, M.; BANCHERO G.; RUBIANES E.; (2002); Ovarian follicular dynamics and endocrine profiles in Polwarth ewes with high and low body condition; *Animal Science*; vol. **74**; pp. 539-545.
- VIÑOLES, C.; (2003); *Effect of nutrition on follicle development and ovulation rate in the ewe*; Doctoral diss. Dept. of Clinical Chemistry, SLU; Acta Universitatis agriculturae Sueciae. Veterinaria vol. 165.
- VIÑOLES, C.; FORSBERG, M.; MARTIN, G. B.; CAJARVILLE, C.; REPETTO, J.; MEIKLE, A.; (2005); Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects

follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones; *Reproduction*; vol. **129**; pp. 299-309.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P. C.; GONG, J. G.; ARMSTRONG, D. G.; (2004); Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences; *Journal of Animal Science*; vol. **82**; (E.suppl.): pp. E63-E74.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P. C.; CAMPBELL, B. K.; HUNTER, M. G.; (2007); Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals; *Theriogenology*; **vol. 68s**; pp. s22 – s29.

WILLIAMS, S. A.; BLANCHE, D.; MARTIN, G. FOOT, R.; BLACKBERRY, M. A.; SCARAMUZZI, R. J.; (2001); Effect of nutritional supplementation on quantities of glucose transporters 1 and 4 in sheep granulosa and theca cells; *Reproduction*; vol. **122**; pp. 947-956.

ANEXO I

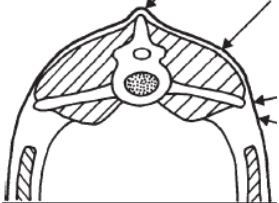
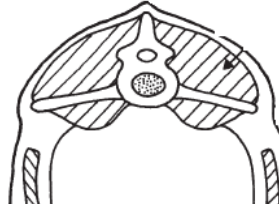


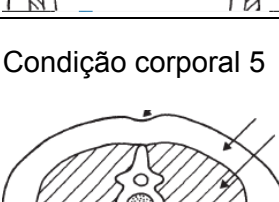
Condição corporal 0	Animal extremamente emaciado e próximo da morte.
Condição corporal 1 	Processos espinhosos proeminentes e aguçados; processos transversos também aguçados penetrando os dedos com facilidade debaixo das suas extremidades sobre a pele e sendo possível palpar as depressões sobre os processos; Músculo <i>Longissimus dorsi</i> sem qualquer cobertura de gordura subcutânea.
Condição corporal 2 	Processos espinhosos proeminentes mas macios, sentindo-se as suas extremidades como pequenos relevos; processos transversos lisos e arredondados, podendo os dedos com uma ligeira pressão penetrar sob as suas extremidades; músculo <i>Longissimus dorsi</i> de espessura moderada e com fina cobertura de gordura subcutânea
Condição corporal 3 	Processos espinhosos pouco salientes, macios e arredondados podendo ser detectados individualmente com alguma pressão dos dedos; processos transversos macios e bem cobertos, sendo necessária uma firme pressão para sentir as suas extremidades; músculo <i>Longissimus dorsi</i> bem desenvolvido e com uma moderada cobertura de gordura subcutânea.
Condição corporal 4 	Processos espinhosos podem ser detectados exercendo pressão, sentindo-se uma linha dura entre as suas extremidades; mesmo exercendo pressão, os processos transversos não se conseguem sentir; músculo <i>Longissimus dorsi</i> muito desenvolvido e com uma espessa cobertura de gordura subcutânea
Condição corporal 5 	Os processos espinhosos não se conseguem palpar, mesmo com uma forte pressão, existindo uma depressão na gordura subcutânea na zona onde as suas extremidades eram palpáveis; não é possível palpar os processos transversos; músculo <i>Longissimus dorsi</i> esta muito desenvolvido e com uma camada de gordura subcutânea muito espessa; podem existir grandes depósitos de gordura na garupa e na cauda.

Tabela I: Descrição das características anatómicas de cada nota de condição corporal
(adaptado de Caldeira, 1988; Thompson e Meyer, 1994; e de Caldeira 1998)

ANEXO II

ANOVA para medidas repetidas – INGESTÕES DIÁRIAS					
	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados Médios	F	P
Intercept	2627158	1	2627158	16562,49	0,000000
GRUPOS	996	2	498	3,14	0,053606
Erro	6662	42	159		
TEMPO	114	5	23	1,13	0,346770
TEMPO*GRUPOS	227	10	23	1,13	0,342840
Erro	4229	210	20		

Tabela I – Teste ANOVA para medidas repetidas referente às ingestões diárias e interações entre tempo e grupos.

ANOVA para medidas repetidas - AGNE					
	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados Médios	F	P
Intercept	2,547632	1	2,547632	482,4236	0,000000
GRUPO	0,008251	2	0,004126	0,7812	0,467924
Erro	0,142584	27	0,005281		
TEMPO	0,023888	4	0,005972	3,9309	0,005106
TEMPO*GRUPO	0,044878	8	0,005610	3,6924	0,000760
Erro	0,164081	108	0,001519		

Tabela II - Teste ANOVA para medidas repetidas referente às concentrações séricas de AGNE e interações entre tempo e grupos.

ANOVA para medidas repetidas - UREIA					
	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados Médios	F	p
Intercept	9713,550	1	9713,550	2512,831	0,000000
GRUPOS	25,435	2	12,718	3,290	0,052643
Erro	104,371	27	3,866		
TEMPO	40,139	4	10,035	6,252	0,000146
TEMPO*GRUPOS	28,991	8	3,624	2,258	0,028525
Erro	173,348	108	1,605		

Tabela III - Teste ANOVA para medidas repetidas referente às concentrações séricas de Ureia e interações entre tempo e grupos.

ANOVA para medidas repetidas - INSULINA					
	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados Médios	F	p
Intercept	30298,94	1	30298,94	503,3937	0,000000
GRUPO	114,48	2	57,24	0,9510	0,398927
Erro	1625,11	27	60,19		
TEMPO	3436,20	4	859,05	19,3093	0,000000
TEMPO*GRUPOS	1124,96	8	140,62	3,1608	0,002960
Erro	4804,81	108	44,49		

Tabela IV - Teste ANOVA para medidas repetidas referente às concentrações séricas de Insulina e interações entre tempo e grupos.

ANOVA para medidas repetidas - GLUCOSE					
	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados Médios	F	p
Intercept	1315,377	1	1315,377	8399,585	0,000000
GRUPOS	0,288	2	0,144	0,921	0,410356
Erro	4,228	27	0,157		
TEMPO	1,119	4	0,280	4,540	0,001988
TEMPO*GRUPOS	0,440	8	0,055	0,893	0,524822
Erro	6,656	108	0,062		

Tabela V - Teste ANOVA para medidas repetidas referente às concentrações séricas de Glucose e interações entre tempo e grupos.

ANOVA para medidas repetidas - ALBUMINA					
	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados Médios	F	p
Intercept	243323,4	1	243323,4	18690,71	0,000000
GRUPOS	6,2	2	3,1	0,24	0,790685
Erro	351,5	27	13,0		
TEMPO	13,1	4	3,3	1,33	0,263405
TEMPO*GRUPOS	53,9	8	6,7	2,74	0,008561
Erro	265,5	108	2,5		

Tabela VI - Teste ANOVA para medidas repetidas referente às concentrações séricas de Albumina e interações entre tempo e grupos.